



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 101 02 878 A 1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 K 5/078**

**DE 101 02 878 A 1**

(21) Aktenzeichen: 101 02 878.4  
(22) Anmeldetag: 23. 1. 2001  
(43) Offenlegungstag: 1. 8. 2002

(71) Anmelder:  
HaemoSys GmbH, 07747 Jena, DE  
(74) Vertreter:  
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:  
Steinmetzer, Torsten, Dr., 07743 Jena, DE; Nowak, Götz, Prof. Dr., 99097 Erfurt, DE  
(56) Entgegenhaltungen:  
EP 06 58 585 A2  
J. MED. CHEM. Vol.43, 2000, No.3, S.305, 306, 313, 314;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- (54) Oligo- oder Polyalkylenkoppelte Thrombininhibitoren  
(57) Die Erfindung betrifft neuartige, kovalente Oligo- und Polyalkylenglykolkonjugate mit synthetischen Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen, insbesondere Inhibitoren der Blutgerinnungsprotease Thrombin, synthetische Zwischenstufen zu deren Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Wirkstoffen für die Therapie oder Prophylaxe thrombotischer Komplikationen.

**DE 101 02 878 A 1**

# DE 101 02 878 A 1

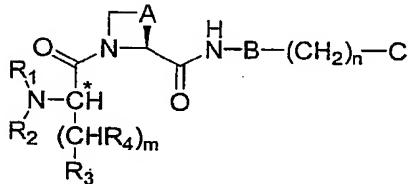
## Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft neuartige, kovalente Oligo- und Polyalkylenglykolkonjugate mit synthetischen Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen, insbesondere Inhibitoren der Blutgerinnungsprotease Thrombin, synthetische Zwischenstufen zu deren Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Wirkstoffen für die Therapie oder Prophylaxe thrombotischer Komplikationen.
- [0002] Die trypsinartige Serinprotease Thrombin ist das zentrale Enzym der Blutgerinnungskaskade. Unter anderem spaltet es Fibrinogen, wodurch ein Fibringerinnssel entsteht, dass durch folgende Quervernetzung, katalysiert durch Faktor XIIIa, stabilisiert wird (Davie et al., 1991 Biochemistry 30, 10363–10370). Auch der Faktor XIIIa selbst wird durch die katalytische Wirkung des Thrombins aus seiner Zymogenform aktiviert. Thrombin kann die Blutgerinnungskaskade zusätzlich durch die Aktivierung der Faktoren V und VIII beschleunigen. Weiterhin ist Thrombin in der Lage, den auf der Thrombocytenoberfläche befindlichen Thrombinrezeptor spezifisch zu stimulieren, was zu einer Plättchenaktivierung führt. Zu hohe Thrombinaktivitäten können zu verschiedenen thrombotischen Komplikationen führen, wie z. B. Myocardinfarkt, tiefer Venenthrombose, peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten oder Lungenembolie. Thrombotische Komplikationen können auch bei Therapien auftreten, bei denen Blut in Kontakt mit nichtphysiologischen Oberflächen kommt, wie z. B. bei operativen Eingriffen, bei der Hämodialyse oder in Herz-Lungenmaschinen.
- [0003] Durch die Verwendung des Thrombininhibitors Hirudin konnte nachgewiesen werden, daß spezifische Thrombinhemmer blutgerinnungshemmende Eigenschaften besitzen und für die Vermeidung thrombotischer Komplikationen geeignet sind (Markwardt, 1970 Methods in Enzymol. 19, 924–932). Hirudin ist ein natürlich vorkommendes Protein, das aus dem medizinischen Blutgel isoliert wurde und seit einigen Jahren in rekombinanter Form vorliegt. Inzwischen wurde rekombinant hergestelltes Hirudin für einige Indikationen, wie z. B. zur Vermeidung von Thrombosen nach Hüftgelenksoperationen oder bei Heparininduzierter Thrombocytopenia, zugelassen (Menear, 1999 Expert Opinion on Investigational Drugs 8, 1373–1384).
- [0004] Da rekombinante Proteine kostenintensiv hergestellt werden müssen, nur parenteral appliziert werden können und körperfreimde Proteine eine antigene Wirkung besitzen, wird intensiv an der Entwicklung niedermolekularer, synthetischer Thrombinhemmstoffe zur Verwendung als oral wirksame Antikoagulantien geforscht. Trotz intensiver Bemühungen sind bisher nur zwei niedermolekulare Thrombininhibitoren, Argatroban und Gabexate Mesilate, in Japan zugelassen, jedoch sind auch diese Verbindungen nur parenteral wirksam und besitzen eine sehr kurze Verweildauer im Blut. Argatroban erhielt im Jahr 2000 auch die Zulassung in den USA.
- [0005] Aus der Literatur ist bekannt, dass man durch kovalente Konjugation mit Makromolekülen, wie z. B. Polysacchariden oder Polyethylenglykolen (PEG), die Verweildauer von Proteinen, Inhibitoren und anderen Wirkstoffen im Blut verlängern kann. Dies gilt z. B. auch für ein PEG-gekoppeltes Hirudin (Kurfürst et al., WO 91/08229) oder einen PEG-gekoppelten, niedermolekularen Thrombinhemmstoff basierend auf der CRC-220 (Stüber et al. Peptide Research 8, 78–85, (1995); Stüber und Koschinsky EP 0658 585 A2). Beide PEG-Inhibitoren besitzen eine längere Halbwertszeit im Blut von Versuchstieren im Vergleich zu den freien, unmodifizierten Verbindungen.
- [0006] Aus der Entwicklung niedermolekularer Thrombinhemmstoffe ist bekannt, dass man die für die Bindung notwendigen basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, als auch deren Mimetika 4-Amidinophenylglycin oder 3- und 4-Amidinophenylalanin durch geeignete decarboxylierte Analoga ersetzen kann, ohne dass ein Verlust an Thrombinaffinität auftritt. Beispiele dafür sind Verbindungen mit C-terminalem Agmatin (D-Phe-Pro-Agmatin; Bajusz et al., 1982 Folia Haematol., Leipzig 109, 16–21), Noragmatin (Inogatran; Teger-Nilsson, WO 93/11152), 4-Amidinobenzylamin (Mela-gatran, Antonsson et al., WO 94/29336 oder Böhm et al., US 5,852,051) oder 4-Aminomethyl-N(Amidino)Piperidin Sanderson et al., 1997 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7, 1497–1500).
- [0007] Ein Problem bei der Anwendung von Thrombininhibitoren ist oftmals, dass die Leber diese Stoffe rasch aufnimmt, metabolisiert und sezerniert. Dabei können neue Metabolite mit unerwünschten Nebenwirkungen entstehen, die teilweise wieder in den Blutkreislauf abgegeben werden und so z. B. für eine Medikamentenentwicklung nur bedingt geeignet sind. Eine Aufnahme in die Leber wurde z. B. für Thrombininhibitoren aus völlig verschiedenen Substanzklassen gezeigt, wie z. B. für CRC220, TAPAP, NAPAP, Argatroban oder Efegatran.
- [0008] Überraschenderweise konnten wir feststellen, dass die hier beschriebenen Oligo- oder Polyalkylenglykol gebundenen Inhibitoren (Inhibitor-Konjugate) in verstärktem Maß bzw. nahezu vollständig über die Niere eliminiert werden. Das heißt, dass die kovalente Kopplung eines Oligo- oder Polyalkylenglykolanteils an die von uns verwendeten niedermolekularen, synthetischen Thrombininhibitoren deren Ausscheidungsweg verändert. Gleichzeitig erhöht sich die Verweildauer der Inhibitor-Konjugate im Blut im Vergleich zu den freien Inhibitoren und damit auch ihre gerinnungshemmende Wirkung, die strikt von der Konzentration im Blut abhängig ist (Hauptmann und Stürzebecher, 1999 Thrombosis Research 93, 203–241).
- [0009] Unter der Bezeichnung Inhibitor werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung Moleküle verstanden die spezifisch an das aktive Zentrum des Zielenzyms binden und so zu dessen Hemmung führen. Werden solche Moleküle zusammen mit Oligo- oder Polyalkylenglykolen in die erfundungsgemäßen Inhibitor-Konjugate integriert, so bilden sie die Inhibitorstruktur, d. h. den Teil der erfundungsgemäßen Konjugate, dessen Struktur eine spezifische Wechselwirkung mit dem Zielenzym erlaubt. Als bivalente Inhibitor-Konjugate werden solche bezeichnet, deren Oligo- oder Polyalkylenanteil mit zwei Inhibitorstrukturen verknüpft ist.
- [0010] Wir haben gefunden, dass man durch Einbau von decarboxylierten, basischen P1-Resten in Oligo- und Polyalkylenglykol-gekoppelte Verbindungen hochpotente Thrombininhibitor-Konjugate erhalten kann. Zusätzlich haben wir gefunden, dass man auch Thrombininhibitoren mit Oligo- und Polyalkylenglykolen modifizieren kann, die als P1-Rest substituierte Arginylketonderivate besitzen. Bei Einsatz solcher Verbindungen ist man weder auf das im aus dem Stand der Technik bekannten PEG-gekoppelten CRC-220 verwendete, kostenintensive D-4-Amidinophenylalanin noch auf nur unter großem Aufwand herzustellendes rekombinantes Hirudin angewiesen.
- [0011] Diese Oligo- und Polyalkylenglykol-gekoppelten Inhibitoren werden im Gegensatz zu den freien Inhibitoren nicht bzw. nur in geringem Umfang in die Leberzellen aufgenommen und dort verstoffwechselt oder in die Galle über-

# DE 101 02 878 A 1

führt, sondern fast ausschließlich über die Niere eliminiert. Nach subkutaner Applikation der Oligo- und Polyalkylenglykol-gekoppelten Inhibitoren wurden lang anhaltende und für eine Gerinnungshemmung notwendige Blutspiegel der Inhibitoren bestimmt und es wurde festgestellt, das hierfür die stark verzögerte Transferrate der Substanzen zwischen Extravasalraum und Intravasalraum verantwortlich ist. Die gleichmäßige Verteilung nach Resorption aus einem subkutanen Injektionsdepot führt zu einem ausschließlichen Ausfüllen des extrazellulären Wasserraumes, da die Kopplung der Inhibitoren mit Oligo- oder Polyalkylenglykolen zu Substanzen mit vergrößerten Hydrathüllen führt.

[0012] Die von uns entwickelten Verbindungen besitzen die allgemeine Struktur (I)



5

10

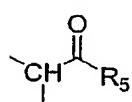
15

wobei

A entweder eine Methylen-, Ethylen oder Propylengruppe ist und der damit gebildete Ring entweder unsubstituiert oder mit einer Hydroxylgruppe substituiert sein kann, die gegebenenfalls mit einem Alkyl- oder Aralkylrest vereinigt ist, oder einer der Gruppen -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-SO-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>- ist;

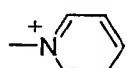
20

B eine Bindung oder



25

ist, wobei R<sub>5</sub> ein Alkylrest ist der 1 bis 4, bevorzugt 1 oder 2 und besonders bevorzugt ein C-Atom umfasst und mit einem oder mehreren gleichen oder unterschiedlichen Halogenatomen, bevorzugt Cl oder F, oder mit einem Rest



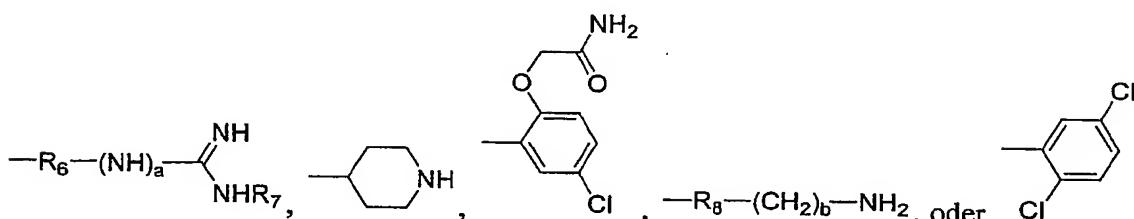
30

substituiert sein kann;

n 0, 1, 2, 3, 4 oder 5 ist,

C einen Rest

35



40

45

darstellt, wobei R<sub>6</sub> und R<sub>8</sub> unabhängig voneinander bivalente Reste sind, ausgewählt aus aromatischen oder gesättigten 6-Ringen, die neben Kohlenstoff noch ein Heteroatom, bevorzugt ein Stickstoffatom, enthalten können und einen oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Alkylsubstituenten tragen können, und R<sub>6</sub> darüber hinaus -NH- sein kann falls a 0 ist, R<sub>7</sub> ein Wasserstoffatom oder -NH<sub>2</sub> ist und a 0 oder 1 und b 0, 1 oder 2 ist;

50

R<sub>1</sub> ein Wasserstoffatom oder ein Arylsulfonyl-, Aralkylsulfonyl-, Cycloalkylmethysulfonyl-, Cycloalkylethylsulfonyl- oder ein Alkylsulfonylrest ist, deren Arylteil gegebenenfalls einen, zwei, drei, vier oder fünf Substituenten, die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten, tragen kann, oder mit einem weiteren Arylrest verknüpft ist;

und entweder

55

R<sub>2</sub> -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-X oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-V-X, ist

55

wobei

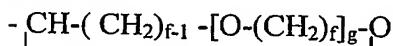
p eine ganze Zahl von 1 bis 5 und q eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist,

60

r eine ganze Zahl von 2 bis 5 und s ist eine ganze Zahl von 1-5 ist,

V eine Bindung oder -CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>- und c eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist, und

X einen Oligo- oder Polyalkylenglykol der Struktur -[O-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>]<sub>e</sub>-OZ oder -[O-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>]<sub>e</sub>-OZ oder einen Cyclus der Struktur



65

darstellt und d eine ganze Zahl von 2 bis 6, e eine ganze Zahl von 3 bis 1000, Z ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest ist oder die gesamte Inhibitorstruktur repliziert, die an die freie Valenz des Restes X gebunden ist, f eine ganze Zahl von 2

# DE 101 02 878 A 1

bis 6 ist und g eine ganze Zahl von 3 bis 10, bevorzugt 3–7 ist; und

R<sub>3</sub> ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann und

5 R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom, Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann, wobei das Wasserstoffatom bevorzugt wird wenn m größer als 1 ist, m 0, 1, 2, 3 oder 4 ist und

am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine D-Konfiguration vorliegt; oder

10 R<sub>2</sub> ein Wasserstoffatom ist und

R<sub>3</sub> -CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-X, -NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-V-X, -S-CH<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-X oder -S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-X ist, wobei q, s und X wie vorstehend definiert sind und t eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist.

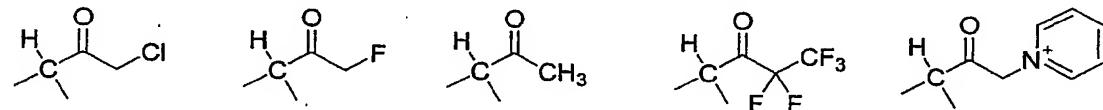
R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom ist

m 1, 2, 3, 4 oder 5 ist und

15 am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine L-Konfiguration vorliegt.

[0013] Trägt die Ringstruktur, die A umfasst, einen Substituenten, so befindet sich dieser im Falle eines 5-Ringes bevorzugt an Position 4, im Falle eines 6-Ringes bevorzugt an einer der Positionen 4 oder 5. 5-Ringe, in deren Ringstruktur durch A ein zweites Heteroatom eingesfügt wird, tragen dieses Heteroatom vorzugsweise in der Position 4. Bildet A zusammen mit seinen Valenzen einen 4-Ring, so ist dieser vorzugsweise unsubstituiert.

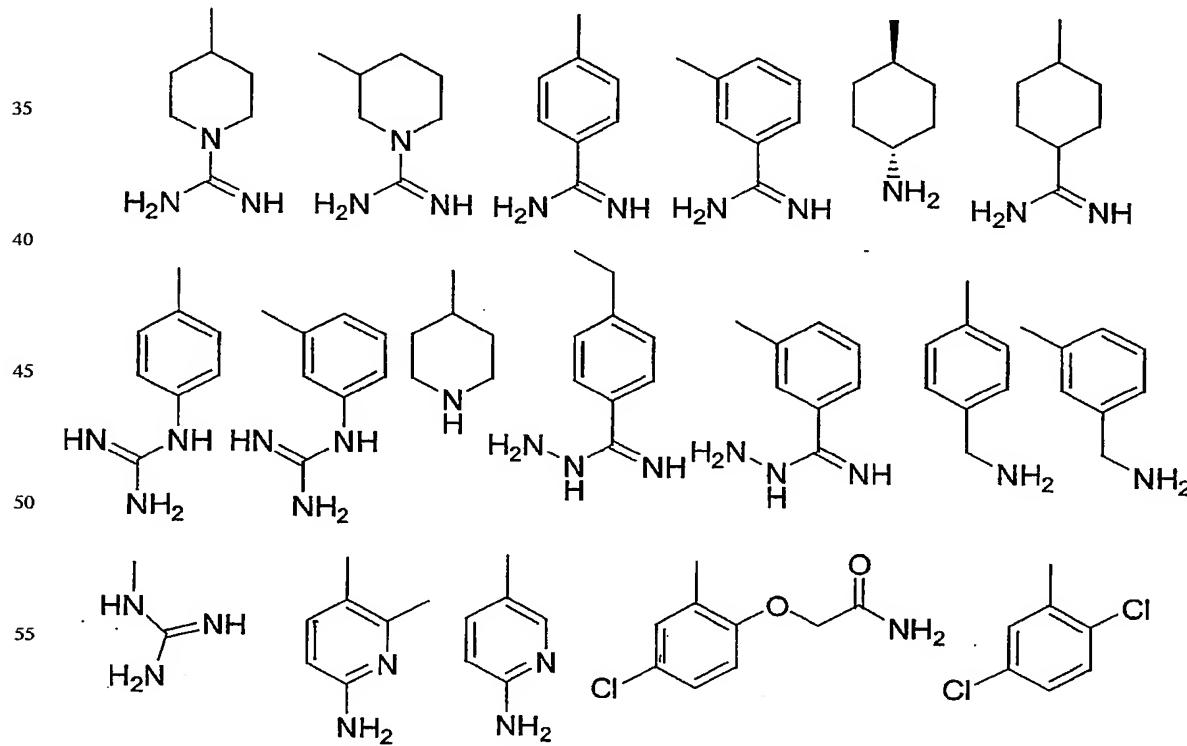
20 [0014] Bevorzugt stellt B eine Bindung oder eine der folgenden Strukturen dar:



25

[0015] Im Rest C ist R<sub>6</sub> bevorzugt 1,4-Piperidindiyl, 1,3-Piperidindiyl, 1,4-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,4-Cyclohexandiyl, 1,3-Cyclohexandiyl oder -NH-. R<sub>8</sub> ist bevorzugt 1,4-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,4-Cyclohexandiyl, 1,3-Cyclohexandiyl oder 2,5-Pyridindiylyl.

30 [0016] Besonders bevorzugt sind für C die folgenden Strukturen:



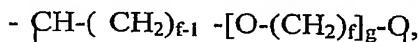
40

[0017] Bevorzugte Substituenten des Arylanteils von R<sub>1</sub> sind Methyl, Ethyl, Propyl, Methoxy oder Ethoxygruppen. Als Halogenatome werden bevorzugt Cl, Br oder F eingesetzt. Bevorzugte Reste R<sub>1</sub> sind damit beispielsweise 3-Methoxy-phenylsulfonyl, 3,4-Dichlor-phenylsulfonyl, Benzylsulfonyl, 3,4-Dimethoxy-phenylsulfonyl, 2,4,5-Trichlor-phenylsulfonyl, 2-Naphthylsulfonyl, 4-Chlor-phenylsulfonyl, Pentamethyl-phenylsulfonyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl. Als besonders bevorzugter Rest R<sub>1</sub> ist ein 4-methoxysubstituierter Phenylsulfonylrest zu nennen, der an den Positionen 2, 3 und/oder 6 gegebenfalls weitere Methylreste tragen kann.

45 [0018] Der von X umfasste Oligo- oder Polyalkylenglykolanteil der erfahrungsgemäßen Verbindungen wird bevorzugt durch ein Ethylenglykol oder Propylenglykol dargestellt, d. h. die Parameter d und f sind vorzugsweise 2 oder 3. Bevor-

# DE 101 02 878 A 1

zugte Kettenlängen ergeben sich aus Werten des Parameters e von 3 und 500, besonders bevorzugt hat das resultierende Polyalkylenglycol ein mittleres Molekulargewicht, das zwischen 750 und 20000 Da liegt, insbesondere um 750, 2000, 3000, 3400, 5000 6000, 10000 oder 20000 Da. Bildet X eine cyclische Struktur, d. h. einen Kronenether der Struktur



5

so nimmt f ebenfalls bevorzugt die Werte 2 und 3 an. Besonders bevorzugte Werte für g sind hier 3, 4, 5 oder 6.

[0019] Überraschenderweise wurde festgestellt, dass die Wirkung solcher Kronenether der von Polyalkylenglykolketten eines erheblich höheren Molekulargewichtes entspricht. So besitzen beispielsweise Kronenetherkonjugate die aus 5 PEG-Einheiten aufgebaut sind eine Eliminierungskinetik im Blut, die der von Polyethylenglykol (PEG)-Konjugaten mit einem Molekulargewicht des PEG Anteils von 5000 bis 10000 Da entspricht. Darüber hinaus stellen Kronenether im Vergleich zu linearen Polyalkylenglykolen, die notwendigerweise eine gewisse Breite der Molekulargewichtsverteilung aufweisen, chemisch einheitlich definierte Verbindungen dar, was insbesondere bei der Bereitstellung von Medikamenten Vorteile mit sich bringt.

10

[0020] Besitzt X die Struktur  $-\text{[O}-(\text{CH}_2)_d\text{-OZ}$  oder  $-\text{[O-CH(CH}_3\text{)-CH}_2\text{]}_e\text{-OZ}$  und wird Z so gewählt, dass es der Inhibitorstruktur entspricht, an welche der Rest X mit seiner freien Valenz gebunden ist, die sich an dem Ende der Oligo- oder Polyalkylenglykolstruktur befindet, welche Z entgegengesetzt liegt, so entsteht ein zweifach inhibitorfunktionalisiertes Oligo- oder Polyalkylenglykol. Mittels solcher bifunktionalen Konjugate lässt sich die Hemmwirkung bezogen auf die Anzahl der vorhandenen Moleküle der Struktur (I) erhöhen. Dies kann unter anderem bei der Modifizierung von Oberflächen mit Molekülen der Struktur (I) von Vorteil sein, wenn eine möglichst hohe Inhibitordichte pro Flächeneinheit erreicht werden soll.

15

[0021] Soweit nicht gesondert definiert bezieht sich der Begriff "Alkyl-" im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf lineare oder verzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> Alkylreste, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. Cycloalkylreste beinhalten 3-8, bevorzugt 3 bis 6 C-Atome. "Alkoxy-" bezieht sich auf solche Reste, deren Kohlenstoffkette 1 bis 8, bevorzugt 1 bis 5, besonders bevorzugt 1 bis 3 C-Atome umfasst. "Aralkyl-" beschreibt Strukturen mit 7 bis 19, bevorzugt 7 bis 13, besonders bevorzugt 7 bis 9 C-Atomen. Arylreste sind Reste mit 6 bis 18, bevorzugt 6 bis 12, besonders bevorzugt 6 C-Atomen. Diese Definition gilt unabhängig voneinander für jeden Fall des Auftretens der obigen Bezeichnungen.

20

[0022] Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung die folgenden Verbindungen der Formel (Ia-f):

25

30

35

40

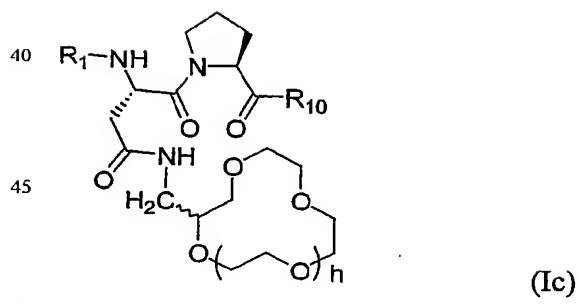
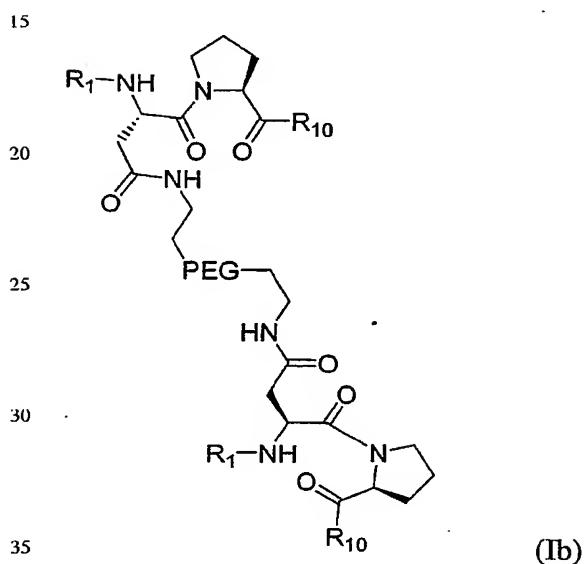
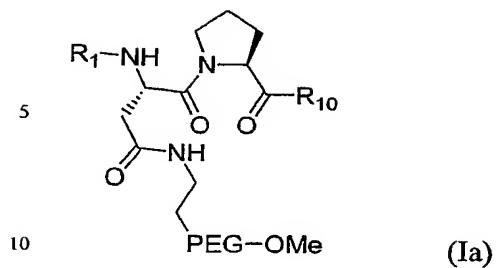
45

50

55

60

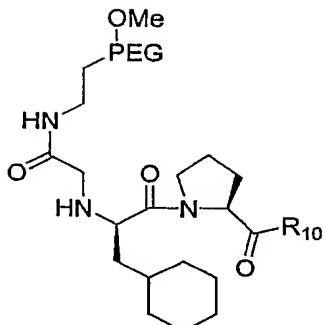
65



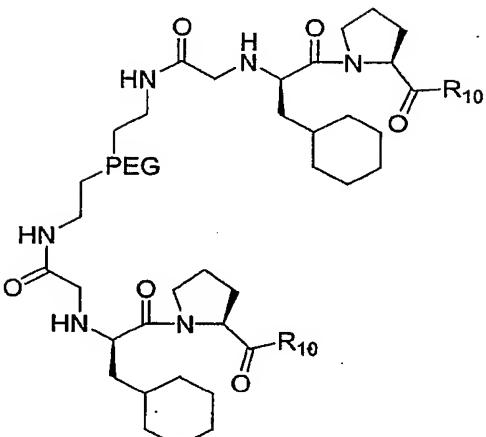
55

60

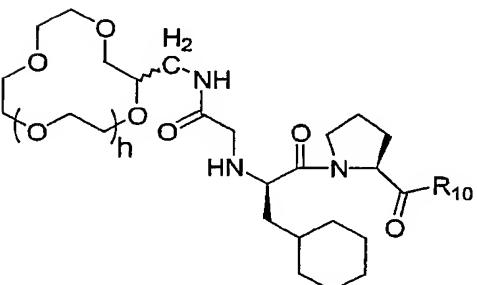
65



(Id)

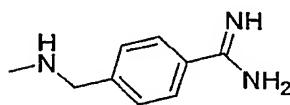


(Ie)

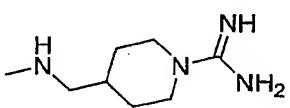


(If)

in denen R<sub>1</sub> ein 4-Methoxy-phenylsulphonyl- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulphonylrest (Mtr) ist, und PEG eine Polyethylenglykolstruktur der Formel  $[-O-C_2H_4]_i-$  darstellt, mit Werten für i von 3 bis 1000, bevorzugt 3 bis 500, wobei solche Werte für i bevorzugt sind, die ein durchschnittliches Molekulargewicht des PEG um von 750 bis 20000 Da, bevorzugt um 750, 2000, 3000, 3400, 5000, 6000, 10000 oder 20000 Da ergeben. Die Variable h steht für 1, 2, 3 oder 4 und R<sub>10</sub> ist



oder



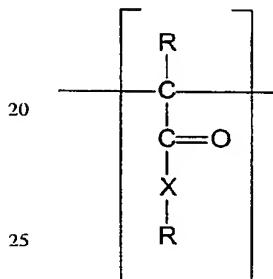
[0023] Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) werden in einer pharmazeutisch geeigneten, nicht-toxischen Salzform hergestellt, wie z. B. als Hydrochlorid-, Hydrobromid-, Acetat-, Lactat-, Zitrat-, Tosylat- oder Trifluoracetalsalz. Sie können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z. B. als Lösungen, Sprays, Salben oder Cremes. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Fließregulierungsmitteln, Netzmitteln,

DE 101 02 878 A1

Dispergiernmitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. H. Sucker et al., Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978).

[0024] Die Verbindungen können in üblicher Weise oral oder parenteral (subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal) verabreicht werden. Sie können für diagnostische Zwecke verwendet werden oder sind auch für biotechnologische Prozesse, wie z. B. Affinitätsreinigungen von Proteasen oder das Entfernen von Proteasen aus Lösungen jeglicher Art geeignet.

[0025] Verbindungen der Struktur (I) sind auch besonders für eine Beschichtung oder Modifikation der Oberfläche makromolekularer Träger geeignet, um die Gerinnung an diesen Trägern zu verhindern bzw. zu reduzieren. Diese makromolekularen Träger, insbesondere Oberflächen medizinischer Gegenstände und Geräte wie z. B Hämodialysatoren, Oxygenatoren und deren Schlauchsysteme, bestehen bevorzugt aus Polymethylmethacrylat, Copolymeren mit Polymethylmethacrylat und analogen Kunststoffen, wie sie in WO 98/46648 (Bucha und Nowak) definiert sind. Zum Einsatz kommen hier Homo- oder Copolymere, zu deren Herstellung mindestens ein Monomertyp eingesetzt wird, der neben einer polymerisierbaren Doppelbindung oder einer polykondensierbaren funktionellen Gruppe eine weitere Carbonylgruppe in Form eines Ketons oder eines Carbonsäurederivats enthält, die nicht an der Polymerisationsreaktion teilnimmt. Bevorzugt enthält das Polymer eine wiederkehrende Einheit der Formel (A):



wobei die Reste R gleich oder verschieden sein können und einen Alkyl oder Arylrest oder ein Wasserstoffatom darstellen. Der Alkylrest kann linear oder verzweigt sein und besteht bevorzugt aus 1 bis 20 Kohlenstoffatomen. Der Arylrest besteht bevorzugt aus 6 bis 18, besonders bevorzugt aus 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Der Rest X ist fakultativ und bedeutet O, N oder  $\text{CH}_2$ . Für den Fall X = N trägt N zusätzlich zu dem in Formel (A) vermerkten einen weiteren Rest R, der unabhängig von den anderen Resten R wie vorstehend definiert ist.

[0026] Besonders bevorzugt als Alkylrest ist ein geradkettiger oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter C<sub>1-8</sub>-Alkylrest, beispielsweise ein Methyl-, Ethyl- oder Propylrest. Beispiele für gegebenenfalls vorhandene Substituenten umfassen ein oder mehrere Halogenatome, z. B. Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome oder Hydroxylgruppen, C<sub>1-6</sub>-Alkylreste oder C<sub>1-6</sub>-Alkoxyreste oder C<sub>1-6</sub>-Alkylthiolreste. Der Arylrest ist besonders bevorzugt ein monocyclischer oder bicyclischer, gegebenenfalls substituierter Arylrest, der gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome enthalten kann. Beispiele für solche Arylreste sind Phenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Indenyl- oder Isoindenylreste. Beispiele für heteroatomhaltige Arylreste sind C<sub>3-9</sub>-Heteroarylreste, die Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatomen, enthalten. Monocyclische Heteroarylreste umfassen beispielsweise Pyrrol-, Furyl-, Thienyl-, Imidazolyl-, N-Methylimidazolyl-, N-Ethylimidazolyl-, Benzothiazolyl-, Chinazolinyl-, Naphthylpyridinyl-, Chinoliny-, Isochinolinyl- und Tetrazolylreste.

[0027] Ein bevorzugtes Polymer, das solche Gruppen enthält, ist ein Polyalkylmethacrylat (PAMA) mit einem Alkylrest, der vorzugsweise 1–6 C-Atome umfasst, wie z. B. Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylmethacrylat (PEMA) oder Polypropylmethacrylat. Weiterhin können Polyvinylacetat, Polycyclohexylmethacrylate oder Polyphenylmethacrylat eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird Polymethylmethacrylat eingesetzt.

[0028] Auch Copolymeren oder Polymermischungen aus beliebigen Anteilen der vorstehend genannten Polymere untereinander oder mit einer oder mehrerer weiterer Polymerkomponenten, beispielsweise Polystyrol, Polyacrylnitril oder Polyamiden können eingesetzt werden. Bevorzugt beträgt der Anteil der Monomere, die ein Strukturelement (A) aufweisen an solchen Mischpolymeren mindestens 20%, besonders bevorzugt mindestens 40% und ganz besonders bevorzugt mindestens 60%.

[0029] Zur Modifikation solcher Oberflächen wird die Oberfläche mit den erfundungsgemäßen Inhibitorkonjugaten, z. B. in Form einer Lösung, in Kontakt gebracht. Dabei können auch Gemische unterschiedlicher Inhibitorkonjugate der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

55

Experimentelle Methoden

Abkürzungen

60 ACN = Acetonitril  
Cha = Cyclohexylalanin

**CKIBE** = Chlorkohlensäureisobutylester

DIEA = Diisopropylethylamin  
DMT = Dimethyltungstate

68 DMF = Dimethylformamid  
EE = Eicoseneurethylester

63 EE = Essigsäureethylester  
AcOH = Essigsäure

HB TU = 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Hexafluorophosphat

## Experimentelle Methoden

## Abkürzungen

- 60 ACN = Acetonitril  
 Cha = Cyclohexylalanin  
 CKIBE = Chlorkohlensäureisobutylester  
 DIEA = Diisopropylethylamin  
 DMF = Dimethylformamid  
 65 EE = Essigsäureethylester  
 AcOH = Essigsäure  
 HTBU = 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Hexafluorophosphat  
 4-MeO-bs = 4-Methoxy-benzensulfonyl

Mtr = 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-benzensulfonyl

NMM = N-Methyl-Morpholin

OSu = Succinimidester

OtBu = tert. Butylester

PyBOP = Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat

TFA = Trifluoressigsäure

THF = Tetrahydrofuran

5

[0030] Analytische HPLC: Shimadzu LC-10A System, Säule: Vydac C<sub>18</sub>, 5 µm (250 × 4 mm) Lösungsmittel A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in ACN, Gradient: 10% B bis 60% B in 50 min, 1 ml/min Fluß, Detektion bei 220 oder 215 nm.

10

[0031] Präparative HPLC: Shimadzu LC-8A System, Säule: Vydac C<sub>18</sub>, 10 µm (250 × 22 mm) Lösungsmittel A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in ACN, Gradient: 20% B bis 65% B in 120 min, 10 ml/min Fluß, Detektion bei 220 nm.

10

### Massenspektroskopie

15

[0032] Die Massenspektren wurden auf einem Kompact Probe der Firma Kratos (Manchester, England) mit einem Flugzeitmessungsdetektor und α-Cyano-Hydroxyzimtsäure als Matrix gemessen.

### Bestimmung der kinetischen Konstanten

20

[0033] Zur Bestimmung der Thrombinhemmwirkung durch alle reversibel bindenden Inhibitoren und Inhibitor-Konjugate wurden 175 µl Tris-Puffer (0,05 mM, 0,1 M NaCl, pH 7,8; enthält den Inhibitor) und 50 µl Substrat (d-Phe-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O, Konzentrationen im Messansatz 360, 120 und 60 µM) bei Raumtemperatur gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl humanes α-Thrombin (Kordia, finale Thrombinkonzentration im Messansatz 0,16 nM) gestartet. Über einen Zeitraum von 5 min wurde die Änderung der Absorption bei 405 nm mittels eines Microplate Readers (Lab-systems iEMS Reader MF) bestimmt. Nach Berechnung der Anstiege (Reaktionsgeschwindigkeiten) wurden die K<sub>i</sub>-Werte nach Dixon (Biochem. J. 55, 170–171, 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K<sub>i</sub>-Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.

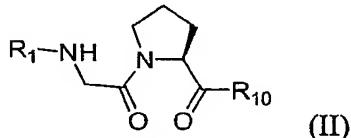
25

[0034] Auf analoge Weise wurden die K<sub>i</sub>-Werte für Trypsin bestimmt.

[0035] Für die Optimierung der Inhibitor-Konjugate, insbesondere aus den nachfolgenden Beispielen 1 und 2, wurde nach geeigneten Resten R<sub>1</sub> gesucht, die eine möglichst starke Thrombinhemmung ermöglichen. Um die Selektivität der Verbindungen zu untersuchen wurden auch die Hemmkonstanten für Trypsin bestimmt. Je größer der Quotient [K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>/K<sub>i</sub><sub>Thrombin</sub>], desto selektiver ist die Verbindung als Thrombininhibitor. Um die Synthese zu erleichtern, wurde diese Optimierung zunächst ohne Kopplung mit einem Polyalkylenglykolrest an Inhibitormolekülen der Formel (II), wie in Tabelle I aufgeführt, vorgenommen. Diese Verbindungen, die selbst als Thrombininhibitoren aktiv sind, können als synthetische Zwischenstufen für die Inhibitorkonjugate der Formel (I) verwendet werden. Als zentraler Baustein wurde konstant ein Glycyl-Prolyl-Dipeptid in die Inhibitoren eingebaut.

30

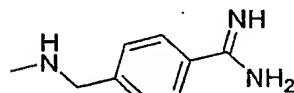
35



40

[0036] Die Ergebnisse der Selektivitätsbestimmung sind in Tabelle I gezeigt, wobei R<sub>10</sub> für die Verbindungen der Tabelle die Struktur

45



50

einnimmt.

55

60

65

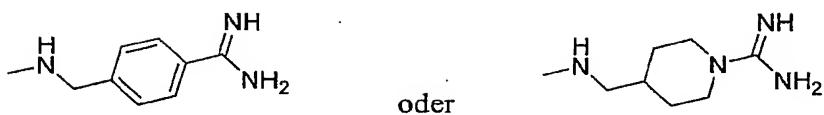
# DE 101 02 878 A 1

Tabelle 1

Nr.	R <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> Thrombin (nM)	K <sub>i</sub> Trypsin (nM)	Ki Trypsin/ Ki Thrombin
1	4-Methoxy-bs*	0,76	22,66	29,7
2	Mtr**	1,3	15,7	12,1
3	3-Methoxy-bs	1,9	3	1,6
4	3,4-Dichlor-bs	2,5	5,8	2,3
5	3-Chlor,4-Methyl-bs	3,5	6,2	1,8
6	Benzylsulfonyl	3,6	7,4	2,1
7	3-Chlor-bs	3,8	3,7	0,97
8	3,4-DiMethoxy-bs	4,7	19,6	4,2
9	2,4,5-TriChlor-bs	5,9	19,5	3,3
10	1-Naphthylsulfonyl	7,8	3,9	0,5
11	3,5-DiChlor-bs	8,5	3,4	0,4
12	2-Naphthylsulfonyl	8,5	58	6,8
13	4-Chlor-bs	10,0	27,3	2,7
14	2,4-DiChlor, 5-Methyl-bs	10,5	11,8	1,1
15	Bs	10,8	10,4	0,96
16	PentaMethyl-bs	12,7	27,8	2,2
17	2,3-DiChlor-bs	12,7	11,1	0,87
18	2,3,5,6-TetraMethyl-bs	13,4	34,0	2,5
19	2,4,6-TriIsopropyl-bs	13,5	9,1	0,67
20	Cyclohexylmethylsulfonyl	13,6	3,1	0,22
21	2,4-DiChlor-bs	15,1	17,5	1,2
22	4-Methyl-bs	16,1	14,2	0,88
23	2,3,4-TriChlor-bs	16,4	11,7	0,71
24	2,4,6-TriMethyl-bs	16,6	13,4	0,80
25	2,4-DiChlor, 6-Methyl-bs	16,9	19	1,1
26	4-Ethyl-bs	19,1	50,2	2,6
27	2-Chlor-bs	19,3	19,1	0,98
28	Pbf***	30,3	37,1	1,2
29	4-tert.Butyl-bs	32,2	10,4	0,32
30	3-Nitro-bs	38,0	16,1	0,42
31	Phenylethylsulfonyl	41,9	16,5	0,39
32	trans-Styrenesulfonyl	44,3	2,1	0,05
33	3-Cyano-bs	48	22,5	0,47
34	4-Cyano-bs	76	24,9	0,33
35	4-Nitro-bs	115	12,6	0,11

\*bs = Benzensulfonyl; \*\*Mtr = 2,3,6-Trimethyl-4-methoxy-bs, \*\*\*Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethylidihydrobenzofuran-5-Sulfonyl

[0037] Als besonders geeignete Thrombininhibitoren mit guter Trypsinselektivität erwiesen sich die Verbindungen der Struktur (II), bei denen R<sub>1</sub> einen 4-Methoxy-benzensulfonyl- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest und R<sub>10</sub> einen Rest

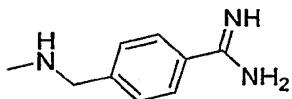


darstellt.

5

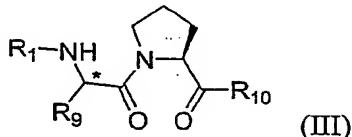
[0038] In Folge dieser Arbeiten wurde das Glycin durch trifunktionelle Aminosäuren ausgetauscht. Selektivitätswerte für die entstehenden Verbindungen der Struktur (III), die analog zu den in Tabelle I angegebenen Werten erhalten wurden, sind in Tabelle II aufgeführt. Dabei sind in Spalte 3 diejenigen Säurereste und Aminosäurereste aufgeführt, die von R<sub>9</sub> zusammen mit der Aminogruppe am benachbarten C-Atom und der Carbonylgruppe gebildet werden, die mit dem Stickstoff des Heterocyclus eine Amidbindung bildet. Auch für die Verbindungen der Tabelle II ist R<sub>10</sub>

10



15

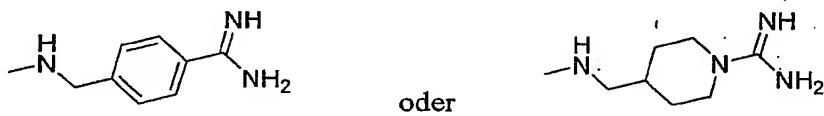
[0039] Besonders geeignete Verbindungen der Struktur (III), die selbst als Thrombininhibitoren aktiv sind, sind als synthetische Zwischenstufen ebenfalls von dieser Anmeldung umfaßt.



20

[0040] Dies gilt insbesondere für Verbindungen der Struktur III, für die R<sub>1</sub> einen 4-Methoxy-phenylsulfonyl- oder einen 4-Methoxy-1,3,6-trimethylphenylsulfonylrest darstellt, R<sub>9</sub> einen der Reste -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-C(O)OR<sub>11</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-R<sub>12</sub>, oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-C(O)NH<sub>2</sub> darstellt, wobei R<sub>11</sub> ein Wasserstoffatom, ein C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkylrest, ein C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub> Aralkylrest oder ein C<sub>6</sub> bis C<sub>12</sub> Alkylrest ist, R<sub>12</sub> eine der Gruppen NH<sub>2</sub>, OH oder SH ist, und j 1, 2, 3 oder 4, bevorzugt 1 oder 2 ist, R<sub>10</sub>

25



30

ist und am mit \* gekennzeichneten C-Atom eine L-Konfiguration vorliegt.

35

Tabelle 2

Nr.	R <sub>1</sub>	-NH-CHR <sub>9</sub> -CO-	K <sub>i</sub> Thrombin (nM)	K <sub>i</sub> Trypsin (nM)	Ki Trypsin/ Ki Thrombin
36	2-Naphthylsulphonyl	Asp(OBzl)	1,3	17,6	13,6
37	2-Naphthylsulphonyl	Diaminopropionsäure	2,4	10,3	4,3
38	2-Naphthylsulphonyl	Ser	2,54	27,6	10,9
39	2-Naphthylsulphonyl	Asn	3,4	37,4	11
40	2-Naphthylsulphonyl	Gln	3,8	16,1	4,2
41	2-Naphthylsulphonyl	Thr	5,24	54,5	10,4
12	2-Naphthylsulphonyl	Gly	8,5	58	6,8
42	2-Naphthylsulphonyl	Asp	24,1	69	2,9
43	2-Naphthylsulphonyl	D-Asn	52,5	22,4	0,42

40

45

50

55

60

65

44	4-Methoxy-bs	Asn	0,215	53	246
45	4-Methoxy-bs	Ser	0,255	17	67
46	4-Methoxy-bs	Asp(OMe)	0,68	21,4	31
47	4-Methoxy-bs	Gly	0,76	23	30
48	4-Methoxy-bs	Asp	1,6	77	48

10

## Beispiele

## Beispiel 1

15

[0041] Herstellung von 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(PEG2000-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid (Die Synthese der Verbindung ist in der nachstehenden Abb. 1 weiter veranschaulicht):

20

## A) Z-Pro-4-(Cyano)Benzylamid

25

[0042] 7,27 g (29,16 mmol) Z-Pro-OH und 3,2 ml (29,16 mmol) NMM wurden in 200 ml THF unter Rühren gelöst. Der Ansatz wurde danach auf -15°C gekühlt und mit 3,79 ml (29,16 mmol) CKIBE versetzt. Nach ca. 10 min bei -15°C wurden 4,24 g (32 mmol) 4-(Cyano)Benzylamin hinzugefügt und eine weitere Stunde bei -15°C und weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 500 ml EE gelöst und 3 × mit 5% KHSO<sub>4</sub>-Lösung, 1 × mit NaCl-gesättigter Lösung, 3 × mit NaHCO<sub>3</sub>-gesättigter Lösung und 3 × mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeengt. Ausbeute: 9,9 g (27,2 mmol) Öl, 93%, HPLC: 31,67 min

30

## B) Z-Pro-4(Acetyl-oxamidino)Benzylamid

35

[0043] 9,5 g (26,1 mmol) Z-Pro-4-(Cyano)Benzylamid wurden in 300 ml Methanol gelöst und mit 3,1 g (45 mmol) Hydroxylamin Hydrochlorid und 7,83 ml (45 mmol) DIEA unter Rühren versetzt. Der Ansatz wurde 4 h unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das ausgefallene Zwischenprodukt (HPLC: 18,18 min) wurde abgesaugt, im Vakuum getrocknet, bei Raumtemperatur in 200 ml AcOH gelöst und in 3 Portionen mit 75 mmol Acetanhydrid versetzt. Nach 30 Minuten wurde das Lösungsmittel und überschüssiges Acetanhydrid im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in EE gelöst. Es wurde 3 × mit 5% KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 × mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, dabei fällt bereits das Produkt als Feststoff aus, das abgesaugt, mit Wasser auf der Frische gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 6,4 g (14,6 mmol) 56%; weiße Kristalle, IIPLC: 24,37 min

40

## C) H-Pro-4(Amidino)Benzylamid × 2HCl

45

[0044] 6 g (13,6 mmol) Z-Pro-4(Acetyl-oxamidino)Benzylamid werden in 200 ml 90%iger AcOH unter Rühren gelöst und unter Schutzgas mit 0,5 g 10%igem Palladium auf Aktivkohle versetzt. Dann wird mittels Wasserstoff 12 h hydriert und der Katalysator abgefiltert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt, der Rückstand in 100 ml 0,5 N HCl gelöst und dann wieder im Vakuum eingeengt und getrocknet.

Ausbeute: 3,3 g (10,3 mmol) 76% Feststoff, HPLC: 11,3 min (Start bei 0% B)

## D) 4-MeO-benzensulfonyl-Asp-OtBu

50

[0045] 10 g (52,8 mmol) H-Asp-OtBu (Novabiochem) wurden in 250 ml H<sub>2</sub>O und 150 ml ACN unter Rühren bei Raumtemperatur suspendiert und mit 13 ml (75 nmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde im Eisbad gekühlt. Dann wurden innerhalb einer Stunde 11,7 g (55 mmol) 4-Methoxy-benzensulfonylchlorid, gelöst in 100 ml ACN, zugetropft. Der pH-Wert wurde während dieses Zeitraums kontrolliert und durch zusätzliche DIEA-Zugabe auf 8–9 eingestellt. Danach wurde der Ansatz weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur und bei einem pH-Wert von 8–9 gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in 300 ml Wasser bei einem pH-Wert von ca. 9 gelöst. Die wässrige Phase wurde 2 × mit Ether extrahiert und danach durch Zusatz von 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf einen pH-Wert von ca. 3 eingestellt. Die saure, wässrige Phase wurde anschließend 3 × mit EE extrahiert, die vereinigte EE-Phase wurde danach noch 2 × mit 5 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 × mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Danach wurde der EE im Vakuum entfernt, das verbleibende Öl wurde in heißem EE gelöst und mit Hexan überschichtet. Das Produkt kristallisierte bei ca. 4°C. Ausbeute: 13,6 g, HPLC bei 28,9 min

E) 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OtBu

65

[0046] 5 g (ca. 2,5 mmol) Amino-PEG<sub>2000</sub>-Monomeithylether (Rapp Polymere, Tübingen) und 2,7 g (7,5 nmol) 4-MeO-bs-Asp-OtBu wurden in 200 ml DMF und 50 ml ACN bei Raumtemperatur gelöst und danach im Eisbad abgekühlt. Dann wurden 2,84 g (7,5 nmol) HBTU und 3,48 ml (20 mmol) DIEA hinzugegeben und der Ansatz für weitere

# DE 101 02 878 A 1

30 min unter Eiskühlung und anschließend weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rückstand in wenig heißem Methanol gelöst und mit einem großen Überschuß an Ether versetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde ins Eisbad gestellt, danach wurde das ausgefallene Produkt abgesaugt und mit Ether gewaschen und getrocknet. Die Festsubstanz wird wieder in wenig, heißem Methanol gelöst und mit einem großen Überschuß an Isopropanol versetzt. Beim Sintern im Eisbad fällt das Produkt aus, es wird abgesaugt und auf der Fritte mit Isopropanol gewaschen und danach im Vakuum getrocknet. Die Verbindung wird getrocknet und in dieser Form für die weitere Synthese verwendet.

Ausbeute: 5,5 g, HPLC 35,1 min

F) 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OH

5

10

**[0047]** 5 g 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OtBu wurden bei Raumtemperatur in 150 ml 1 N HCl in Essigsäure gelöst, der Ansatz wurde 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und danach das Lösungsmittel wieder im Vakuum abgedampft, um Säurespuren zu entfernen. Dieser Schritt wird noch 2 × wiederholt, der Rückstand in wenig heißem Methanol gelöst und das Produkt mit Ether in der Kälte gefällt. Nach Absaugen und Waschen mit Ether wird das Produkt im Vakuum getrocknet und in dieser Form für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Ausbeute: 4,7 g, HPLC 30,5 min

15

G) 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid

20

**[0048]** 2 g (ca. 0,9 mmol) 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OH und 0,57 g (1,8 mmol) des unter C) beschriebenen H-Pro-4-Amidinobenzylamids × 2HCl werden in 50 ml DMF unter Rühren gelöst. Nach Kühlung mit einem Eisbad werden 0,94 g (1,8 mmol) PyBOP und 0,93 ml (5,4 mmol) DIEA hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30 Minuten unter Eiskühlung und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rückstand an Biogel P2 (Firma Biorad) mit 2%iger Essigsäure als Laufmittel getrennt. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum eingeengt und aus 80 %igem tert. Butanol lyophilisiert. In einem zweiten Schritt wurde anschließend das Produkt durch Ionenaustauschchromatographie an Fractogel CM mit einem Ammoniumacetatgradienten getrennt und die vereinten Fraktionen 3 × nacheinander lyophilisiert.

HPLC: 30,66 min

25

30

## Beispiel 2

**[0049]** In analoger Weise zum Beispiel 1 wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert, wobei für die Synthese Amino-PEG-Verbindungen mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet wurden.

35

4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>5000</sub>-4Me)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>10000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>20000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>5000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>10000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>20000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid

40

**[0050]** Durch Verwendung eines bifunktionalisierten Amino-PEG wurden die beiden folgenden Verbindungen hergestellt, wobei die Verbindungsreihe in dieser und den folgenden Formeln die Verknüpfung der beiden Inhibitoreinheiten mittels des angegebenen bifunktionellen Polyalkylenglykols darstellt.

45

4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>3000</sub>)-Pro-4-Amidinobenzylamid

4-MeO-bs-Asn( )-Pro-4-Amidinobenzylamid

50

4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>6000</sub>)-Pro-4-Amidinobenzylamid

55

4-MeO-bs-Asn( )-Pro-4-Amidinobenzylamid

60

**[0051]** Durch Verwendung von Aminomethyl-Crown-Ethern wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

4-MeO-bs-Asn(CH<sub>2</sub>-Crown5)-Pro-4-Amidinobenzylamid

65

4-MeO-bs-Asn(CH<sub>2</sub>-Crown6)-Pro-4-Amidinobenzylamid

# DE 101 02 878 A 1

## Beispiel 3

Herstellung von D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-Amidinobenzylamid

5 [0052] (Die Synthese der Zielverbindung ist in der nachfolgenden Abb. 2 weiter veranschaulicht):

A) D-N(Benzoyloxycarbonylmethyl)Cha-OtBu

10 [0053] Der Ausgangsstoff D-N(Benzoyloxycarbonylmethyl)Cha-OtBu wurde entsprechend der beschriebenen Literaturmethode hergestellt (Previle et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7, 1563–1566 (1997)).

B) D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu × Acetat

15 [0054] 3,75 g (10 mmol) D-N(Benzoyloxycarbonylmethyl)Cha-OtBu wurden in einer Mischung aus 100 ml Methanol, 5 ml Essigsäure und 5 ml H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur und Normaldruck 3 h mit 0,3 g 10% Pd/C als Katalysator wie üblich hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, und das Filtrat unter Zusatz von Toluol 3 Mal im Vakuum eingeengt. Die verbleibende Substanz wird in 15 ml Essigsäure gelöst und unter Zusatz von 200 ml Diethylether gefällt (weißer Feststoff).

C) Z-D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu × Cyclohexylamin

20 [0055] 2 g (5,8 mmol) D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu × Acetat wurden in 75 ml Wasser, 15 ml 1 N NaOH und 75 ml Dioxan unter starkem Rühren suspendiert und im Eisbad gekühlt. Danach wurden 7 mmol Z-Cl, gelöst in 30 ml Dioxan, im Verlauf von 30 Minuten zugetropft, noch 30 Minuten unter Eiskühlung und weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf ca. 9–10 mehrmals nachgestellt. Danach wurde das Lösungsmittel 25 im Vakuum entfernt und der Rückstand in EE und Wasser aufgenommen und 3 × mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 × mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand wurde in Ether gelöst und als Cyclohexylamin-Salz kristallisiert, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

D) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OtBu

30 [0056] 0,62 g (1,2 mmol) Z-D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu × Cyclohexylamin wurden in 200 ml EE suspendiert und 3 × mit 50 ml 5% KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 × mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand und 2 g (0,4 mmol) Amino-PEG5000-OMe wurden in 100 ml DMF unter Röhren gelöst und im Eisbad abgekühlt. Dazu wurden 0,62 g (1,2 mmol) PyBOP und 3 mmol DIIEA gegeben, weitere 30 Minuten unter Eiskühlung und danach 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft, der Rückstand in wenig, heißem Methanol gelöst und in der Kälte mit Isopropanol gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Die Festsubstanz wurde wieder in wenig, heißem Methanol gelöst und in der Kälte mit Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet (Feststoff).

Ausbeute: 1,9 g

40 E) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OH

[0057] Der tert. Butylester wurde wie im Beispiel 1F beschrieben abgespalten.

Ausbeute: 1,7 g (Feststoff)

45 F) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

50 [0058] Das unter Beispiel 1C hergestellte H-Pro-4(Amidino)Benzylamid × 2HCl wurde entsprechend der Vorschrift aus Beispiel 1G an 1 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OH angekoppelt. Das Produkt wurde nacheinander mit Isopropanol und Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet (Rohprodukt: 0,9 g).

G) H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

55 [0059] 0,9 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid wurden wie in Beispiel 1 C beschrieben 4 h hydriert, nach abfiltrieren des Katalysators, einengen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde der Rückstand in wenig heißem Methanol gelöst und mit viel Ether gefällt und abgesaugt. Das gefällte Rohprodukt wurde an Biogel P2 mit 2% AcOH als Laufmittel gereinigt. In einem zweiten Schritt wurde anschließend das Produkt durch Ionenaustauschchromatographie an Fractogel CM mit einem Ammoniumacetatgradienten getrennt und die vereinten Fraktionen 3 × nacheinander lyophilisiert.

60 Beispiel 4

[0060] In analoger Weise zum Beispiel 3 wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert, wobei für die Synthese Amino-PEG-Verbindungen mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet wurden.  
65 H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>10000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>20000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

[0061] Durch Verwendung eines bifunktionalisierten Amino-PEG wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>6000</sub>)Cha-Pro-4-Amidinobenzylamid

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH--Pro-4-Amidinobenzylamid

5

[0062] Durch Verwendung von Aminomethyl-Crown-Ethern wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown5)-Pro-4-Amidinobenzylamid

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown6)-Pro-4-Amidinobenzylamid

10

## Beispiel 5

[0063] D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)N(Amidino)Benzylamid (Die Synthese der Zielverbindung ist in der nachfolgenden Abb. 3 weiter veranschaulicht):

15

## A) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-Piperidin

[0064] 166 mmol (18,95 g, 19.91 ml) 4-Aminomethylpiperidin werden in 100 ml DCM gelöst und unter magnetischen Röhren im Eisbad gekühlt. Über einen Zeitraum von einer Stunde werden 182.6 mmol (25.94 g, 21.78 ml) Trifluoroessigsäureethylester zugeropft. Danach wird der Ansatz eine weitere Stunde im Eisbad gekühlt und danach noch 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das während der Reaktion ausfallende Produkt wird abgesaugt.

Ausbeute: 18.68 g = 53.55%

MS: berechnet, 210.17; gefunden 211,3 [M + H]<sup>+</sup> (Maldi)

DC: Rf n-Butanol/Eisessig/Wasser 4/1/1 = 0.51

20

25

## B) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin

[0065] Zu einer Lösung von 18 g (85.6 mmol) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-Piperidin in 150 ml DMF werden 14.89 ml (85.6 mmol) DIET hinzugegeben. Unter Röhren im Eisbad gibt man zu dieser Mischung 22.36 g (89.75 mmol) Z-Osu, das vorher in 75 ml DMF gelöst wurde. Der Ansatz wird 1 Stunde im Eisbad und danach 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rest in Essigester aufgenommen und 3 × mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 × mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die EE-Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel eingeengt. Umkristallisation aus Essigester/Hexan (weiße Kristalle).

Ausbeute: 28.15 g = 95.52%

MS: berechnet: 344.27; gefunden: 345,1

DC: Rf n-Butanol/Eisessig/Wasser 4/1/1 = 0.83

Benzene/Aceton/Eisessig 27/10/0.5 = 0.73

30

35

## C) 4-(Aminomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin

40

[0066] 27.5 g (79.88 mmol) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin werden in 150 ml Dioxan gelöst und mit 150 ml 1 N NaOH-Lösung versetzt. Der Ansatz wird 3 Stunden bei 40°C gerührt und danach das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Der Rest wird in Wasser aufgenommen und 3 × mit DCM extrahiert. Die vereinigten DCM-Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, danach wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt.

Ausbeute: 13.92 g Öl, 56.09 mmol = 70.2%

MS: berechnet, 248,13; gefunden, 249,3 [M + H]<sup>+</sup>

45

50

## D) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin

[0067] 0.86 g Boc-Pro-OH werden in 60 ml absolutem THF unter magnetischem Röhren gelöst und mit 0.44 ml (4 mmol) NMM versetzt. Der Ansatz wird auf -15°C gekühlt und dann mit 4 mmol (0.52 ml) CKIBE versetzt. Nach weiteren 10 Minuten Röhren bei -15°C werden 1.1 g (4.4 mmol) 4-(Aminomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin zugesetzt und der Ansatz eine weitere Stunde bei -15°C und weiter über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rest in Essigester aufgenommen und nacheinander 3 × mit 5% KHSO<sub>4</sub>-Lösung, 1 × mit gesättigter NaCl-Lösung, 3 × mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und nochmals 3 × mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Danach wird die Essigesterphase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeengt. Umkristallisation aus Essigester/Hexan.

Ausbeute: 1.5 g, 3,3 mmol (82,5%)

55

60

## E) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)Piperidin × Acetat

[0068] 1 g (2,2 mmol) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin werden in Analogie zum Beispiel 1C mit 150 mg Pd/C als Katalysator in Eisessig hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel weitestgehend im Vakuum eingeengt, und das Produkt durch Zusatz mit Diethylether gefällt.

Ausbeute: 0,6 g

65

# DE 101 02 878 A 1

F) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × TFA

[0069] 0,5 g (1,34 mmol) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)Piperidin × Acetat werden mit 0,4 g (2,7 mmol) Pyrazol-Carboxamidin-Hydrochlorid und 0,7 ml (4 mmol) DIEA in 4 ml DMF bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Das DMF wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer Reversed-Phase-HPLC von Salzen und nicht umgesetzten Pyrazol-Carboxamidin-Hydrochlorid getrennt.  
Ausbeute: 0,35 g

G) H-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2HCl

[0070] 0,3 g (0,64 mmol) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × TFA werden mit 5 ml 1 N HCl/Eisessig übergossen und bei Raumtemperatur 1 Stunde stehen gelassen. Der Eisessig wird im Vakuum weitestgehend eingeengt und der Rückstand durch Zugabe von Diethylether gefällt. Das Produkt wird abgesaugt, mit weiterem Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,18 g

H) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × HCl

[0071] 0,15 g (0,46 mmol) des unter Beispiel 5 G hergestellten H-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2HCl wurde entsprechend der Vorschrift aus Beispiel 1G an 1 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OH mittels PyBop/DIEA angekoppelt. Das Produkt wurde nacheinander mit Isopropanol und Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet (Rohprodukt: 0,9 g).

I) D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2 HCl

[0072] 0,8 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × HCl werden in 90%iger Essigsäure analog der Vorschrift 1C hydriert. Das Produkt wird aus Methanol/Ether gefällt und über Biogel P2 und Ionenaustauschchromatographie (Fractogel-CM) gereinigt und lyophilisiert.  
Ausbeute: 0,46 g

## Beispiel 6

[0073] In analoger Weise zum Beispiel 5 wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert, wobei für die Synthese Amino-PEG-Verbindungen mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet wurden.  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2 HCl  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>10000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2 HCl  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>20000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2 HCl

[0074] Durch Verwendung eines bifunktionalisierten Amino-PEG wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>6000</sub>)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 4 HCl

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH- )-Pro-4-Amidinobenzylamid

[0075] Durch Verwendung von Aminomethyl-Crown-Ethern wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown5)-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2HCl  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown6)-Pro-4-(Amidomethyl)-N( Amidino)Piperidin × 2HCl

## Beispiel 7

Herstellung von D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl

[0076] (Die Synthese der Zielverbindung ist in der nachfolgenden Abb. 4 weiter veranschaulicht):

A) H-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl × HCl

[0077] Boc-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl wurde analog der Literaturvorschrift für Boc-Arg(Z<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-Cl (Steinmetzer et al., 1999 J. Med. Chem. 42, 3109–3115) hergestellt. Durch versetzen von 5 g Boc-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl mit 75 ml 1 N HCl in Eisessig wurde selektiv die Boc-Gruppe abgespalten, das Lösungsmittel weitestgehend im Vakuum entfernt und das Produkt durch Zusatz von kaltem Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.  
Ausbeute: 3,7 g

B) Boc-d-Cha-Pro-OH

[0078] Die Verbindung wird entsprechend der in der Literatur beschriebenen Synthesestrategie hergestellt (Steinmetzer et al., 1999 J. Med. Chem. 42, 3109–3115).

# DE 101 02 878 A 1

C) Boc-d-Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl

[0079] Aus 3 g (8.14 mmol) Boc-d-Cha-Pro-OH, 0.9 ml (8.14 mmol) NMM und 1,06 ml (8.14 mmol) CKIBE in 100 ml THF wird bei -15°C das gemischte Anhydrid gebildet. Nach 10 min werden 4,03 g (8.14 mmol) H-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl × HCl hinzugefügt und der Ansatz eine weitere Stunde bei -15°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und wie unter Beispiel 1A beschrieben, aufgearbeitet.  
Ausbeute: 4.6 g (5.7 mmol)

D) H-d-Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl × HCl

[0080] Die Boc-Gruppe wird analog der Vorschrift aus Beispiel 5G abgespalten, das Produkt mit Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.  
Ausbeute: 3.86 g (5.2 mmol)

E) H-d-N(CH<sub>2</sub>-CO-OtBut)Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl × HCl

[0081] 3 g (4 mmol) H-d-Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl × HCl werden in 100 ml DMF gelöst und bei Raumtemperatur mit 0,74 ml (4.15 mmol) Bromessigsäure-tert. Butylester und 1,16 g (5 mmol) Silber(I)Oxid versetzt. Der Ansatz wird über Nacht gerührt und danach die ausgefallenen Silbersalze abzentrifugiert. Das DMF wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und 2 × mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt.  
Ausbeute: 2.7 g (3.1 mmol) Rohprodukt

F) H-d-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl × 2 Trifluoressigsäure

[0082] 2,5 g (2,87 mmol) des Rohproduktes an H-d-N(CH<sub>2</sub>-CO-OtBut)Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl × HCl werden bei Raumtemperatur mit 50 ml 90% Trifluoressigsäure in Wasser versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum weitestgehend entfernt und der Rückstand mit kaltem Diethylether gefällt. Das Rohprodukt wird abgesaugt, mit Ether gewaschen, getrocknet und mit präparativer HPLC gereinigt.

G) H-d-N(CH<sub>2</sub>-CONH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl × 2 Trifluoressigsäure

[0083] 40 mg (0,054 mmol) HPLC gereinigtes H-d-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl × 2 Trifluoressigsäure und 80,75 mg (0,04 mmol) Amino-PEG<sub>2000</sub>-OMe werden in 3 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 57 µl Propanphosphonsäureanhydrid, sowie 55 µl DIEA versetzt. Nach einer Stunde wird das Eisbad entfernt, und der Ansatz weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittel präparativer Umkehrphasenchromatographie gereinigt.  
Ausbeute: 45 mg

## Beispiel 8

### Bestimmung der kinetischen Konstanten

[0084] Bis auf die im Beispiel 6 beschriebene Verbindung sind sämtliche Inhibitoren reversibel bindende Thrombininhibitoren. Die bestimmten K<sub>i</sub>-Werte sind unabhängig von der Kettenlänge des PEG, daher ist für alle Verbindungstypen exemplarisch jeweils nur ein Inhibitor mit seinem K<sub>i</sub>-Wert angegeben, als Referenz werden die kinetischen Konstanten für die Verbindungen mit freier Carboxylgruppe, die keine PEG-Kette gebunden haben, angegeben.

#### Kinetische Konstanten für den reversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 1/2

4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(PEG2000-OMe)-Pro-4-Amidirobenzylamid  
K<sub>Thrombin</sub>: 0,53 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>: 92,53 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>/K<sub>i</sub><sub>Thrombin</sub>: 174  
Referenz: 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asp-Pro-4-Amidinobenzylamid  
K<sub>Thrombin</sub>: 1,6 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>: 77 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>/K<sub>i</sub><sub>Thrombin</sub>: 48

[0085] Bei den Inhibitoren dieses Typs führt die Einführung der PEG-Kette zu einer Verbesserung der Thrombinhemmung- und der Selektivität gegenüber Trypsin.

#### Kinetische Konstanten für den reversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 3/4

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid  
K<sub>Thrombin</sub>: 0,97 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>: 3,4 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>/K<sub>i</sub><sub>Thrombin</sub>: 3,5  
Referenz: H-D-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid (Diese nicht PEG-gekoppelte Referenzverbindung ist identisch mit dem von der Firma Astra beschriebenen Inhibitor H317/86; Gustafsson et al., 1998 Thromb. Haemost. 79, 110–118).

K<sub>Thrombin</sub>: 0,3 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>: 3,6 nM; K<sub>i</sub><sub>Trypsin</sub>/K<sub>i</sub><sub>Thrombin</sub>: 12  
[0086] Bei den Inhibitoren dieses Typs führt die Einführung der PEG-Kette zu einer leichten Verschlechterung der Thrombinhemmung, die Trypsinhemmung bleibt unbeeinflusst.

# DE 101 02 878 A 1

Kinetische Konstanten für den reversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 5 und 6

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin

Ki<sub>Thrombin</sub>: 2,4 nM; Ki<sub>Trypsin</sub>: 239 nM; Ki<sub>Trypsin</sub>/Ki<sub>Thrombin</sub>: 100

5 Referenz: H-D-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin

Ki<sub>Thrombin</sub>: 1,3 nM; Ki<sub>Trypsin</sub>: 226 nM; Ki<sub>Trypsin</sub>/Ki<sub>Thrombin</sub>: 173

[0087] Auch bei den Inhibitoren dieses Typs führt die Einführung der PEG-Kette zu einer leichten Verschlechterung der Thrombinhemmung, die Trypsinhemmung bleibt dagegen nahezu unbeeinflusst.

10 Kinetische Konstanten für den irreversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 7

[0088] Die folgenden kinetischen Konstanten wurden entsprechend dem in der Literatur beschriebenen Verfahren (Stein und Trainor, 1986 Biochemistry 25, 5414–5419) bestimmt.

[0089] H-d-N(CH<sub>2</sub>-CONH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl × 2 Trifluoressigsäure:

15 K<sub>i</sub> = 10,6 nM; k<sub>inact</sub> = 0,08 s<sup>-1</sup>; k<sub>inact</sub>/K<sub>i</sub> = 7,5 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

[0090] Als Referenz wurde die analoge, nicht PEG-gekoppelte Verbindung gemessen:

K<sub>i</sub> = 3,8 nM; k<sub>inact</sub> = 0,079 s<sup>-1</sup>; k<sub>inact</sub>/K<sub>i</sub> = 2,1 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

[0091] Aus der Literatur wurden die Daten für die Chlormethylketon-Leitstruktur D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl (PPACK) entnommen (Walker et al., 1985 Biochem. J. 230, 645–650):

20 K<sub>i</sub> = 25 nM; k<sub>inact</sub> = 0,11 s<sup>-1</sup>; k<sub>inact</sub>/K<sub>i</sub> = 4,4 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

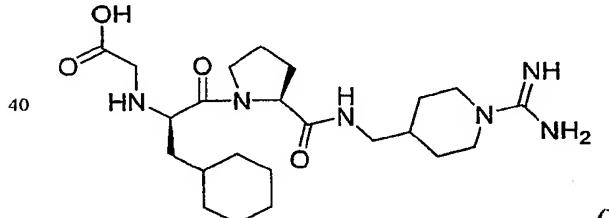
[0092] Die PEG-gekoppelte Verbindung ist etwas weniger aktiv, als die analoge freie Verbindung, andererseits ist sie jedoch ein stärkerer Thrombinhemmstoff als das in der Literatur bereits beschriebene PPACK.

## Beispiel 9

25 Eliminierung der Inhibitorkonjugate

[0093] Vorbemerkungen: Für die Versuche wurden weibliche Wistaratten mit einem Körpergewicht zwischen 150–250 g verwendet. Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten und erhielten Standardfutter und Trinkwasser ad libitum. Die Narkotisierung erfolgte mittels 1,5 g/kg Körpermasse Ethylurethan. Anschließend wurden die rechte und linke Vena jugularis präpariert und Katheter eingebunden, um zu unterschiedlichem Zeitpunkt Blut entnehmen zu können. Der Urin wurde über die gesamte Versuchsdauer gesammelt und die Inhibitorkonzentration mit einem Gerinnungstest bestimmt.

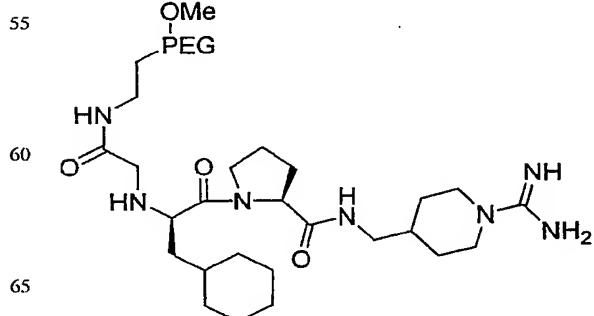
30 [0094] Abb. 5 zeigt die Eliminierung der in Formel (IV) dargestellten Verbindung nach intravenöser Gabe von 10 mg/kg an der Ratte. Die Eliminierungshalbwertszeit beträgt ca. 16.5 min.



35 [0095] Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der kumulativen Wiederfindung im Urin der in Formel (IV) dargestellten Verbindung nach subkutaner Gabe an der Ratte. Es werden ca. 58% der Verbindung im Urin wiedergefunden.

[0096] Zum Vergleich ist ein Beispiel mit einer analogen Verbindung angegeben, an die ein PEG5000 kovalent gekoppelt wurde.

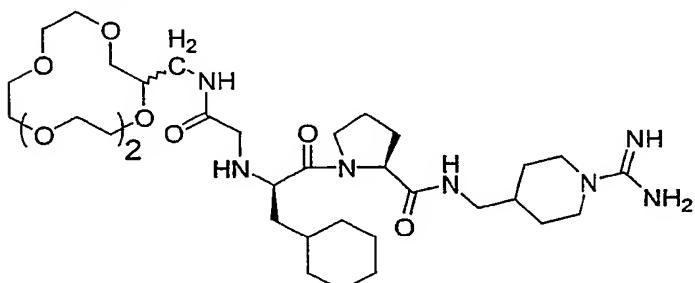
40 [0097] Abb. 7 zeigt den Blutspiegel der unten dargestellten Verbindung der Formel (V) (die PEG-Kette hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 5000 Da) nach subkutaner Gabe von 10 mg/kg. Die bestimmte Eliminierungshalbwertszeit beträgt ca. 2,6 Stunden und ist somit deutlich länger im Vergleich zur freien, nicht pegyierten Verbindung (siehe Abb. 5).



45 [0098] Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der kumulativen Wiederfindung im Urin der Verbindung (V) nach

subkutaner Gabe an der Ratte ( $n = 4$ ). Es werden nahezu 100% der Verbindung im Urin wiedergefunden.

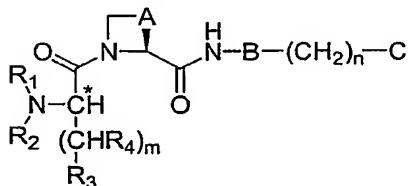
[0099] Abb. 9 zeigt eine halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurve nach subkutaner Gabe von 5 mg/kg der Inhibitorstruktur (VI) an der Ratte. Die berechnete Eliminierungshalbwertszeit beträgt ca. 350 min. Die Halbwertszeit dieser Verbindung ist somit deutlich verlängert.



(VI)

## Patentansprüche

## 1. Verbindung der allgemeinen Struktur (I)

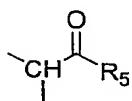


in der

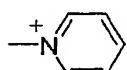
m 0, 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2, 3, 4 oder 5 ist;

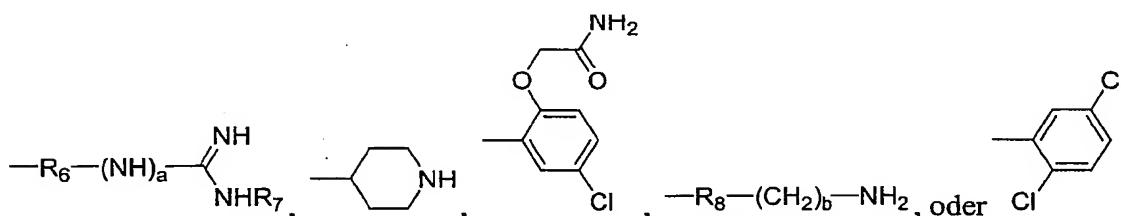
A entweder eine Methylen-, Ethylen oder Propylengruppe ist und der damit gebildete Ring entweder unsubstituiert oder mit einer Hydroxylgruppe substituiert sein kann, die gegebenenfalls mit einem Alkyl- oder Aralkylrest verestert ist, oder eine der Gruppen -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-SO-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>- ist; B eine Bindung oder



ist, wobei R<sub>5</sub> ein Alkylrest ist der 1 bis 4, bevorzugt 1 oder 2 und besonders bevorzugt ein C-Atom umfasst und mit einem oder mehreren gleichen oder unterschiedlichen Halogenatomen oder mit einem Rest



substituiert sein kann;  
C einen Rest



darstellt, wobei a 0 oder 1 und b 0, 1 oder 2 ist und R<sub>6</sub> und R<sub>8</sub> unabhängig voneinander bivalente Reste sind, ausgewählt aus aromatischen oder gesättigten 6-Ringen, die neben Kohlenstoff noch ein Heteroatom enthalten können und einen oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Alkylsubstituenten tragen können, und R<sub>6</sub> darüberhinaus -NH- sein kann falls a 0 ist, R<sub>7</sub> ein Wasserstoffatom oder -NH<sub>2</sub> ist;

R<sub>1</sub> ein Wasserstoffatom oder ein Arylsulfonyl-, Aralkylsulfonyl-, Cycloalkylmethysulfonyl-, Cycloalkylethylsulfonyl- oder ein Alkylsulfonylrest ist, deren Arylteil gegebenenfalls einen, zwei, drei, vier oder fünf Substituenten,

# DE 101 02 878 A 1

die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten, tragen kann, oder mit einem weiteren Arylrest verknüpft ist;

und entweder

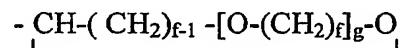
**5**  $R_2 - (CH_2)_p - CO - NH - (CH_2)_q - X$  oder  $-(CH_2)_r - NH - CO - (CH_2)_s - V - X$ , ist  
wobei

**10** p eine ganze Zahl von 1 bis 5 und q eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist,

r eine ganze Zahl von 2 bis 5 und s ist eine ganze Zahl von 1–5 ist,

V eine Bindung oder  $-CO - NH - (CH_2)_c -$  und c eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist, und

X ein Oligo- oder Polyalkylenlykol der Struktur  $-[O - (CH_2)_d]_e - OZ$  oder  $-[O - CH(CH_3) - CH_2]_e - OZ$  oder einen Cyclus der Struktur



**20** darstellt und d eine ganze Zahl von 2 bis 6, e eine ganze Zahl von 3 bis 1000 ist, Z ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest ist oder die gesamte Inhibitorstruktur repliziert, die an die freie Valenz des Restes X gebunden ist, f eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist und g eine ganze Zahl von 3 bis 10, ist; und

**25** R<sub>3</sub> ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann und

R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom, Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann,

m 0, 1, 2, 3 oder 4 ist und

**30** am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine D-Konfiguration vorliegt;  
oder

R<sub>2</sub> ein Wasserstoffatom ist und

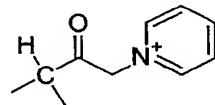
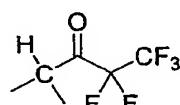
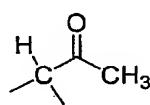
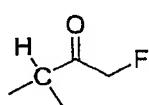
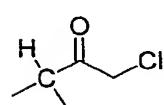
R<sub>3</sub> -CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-X, -NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-V-X, -S-CH<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-X oder -S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-X ist, wobei q, s und X wie vorstehend definiert sind und t eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist; und

**35** R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom ist

m 1, 2, 3, 4 oder 5 ist und

am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine L-Konfiguration vorliegt.

**40** 2. Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei B eine der folgenden Strukturen darstellt



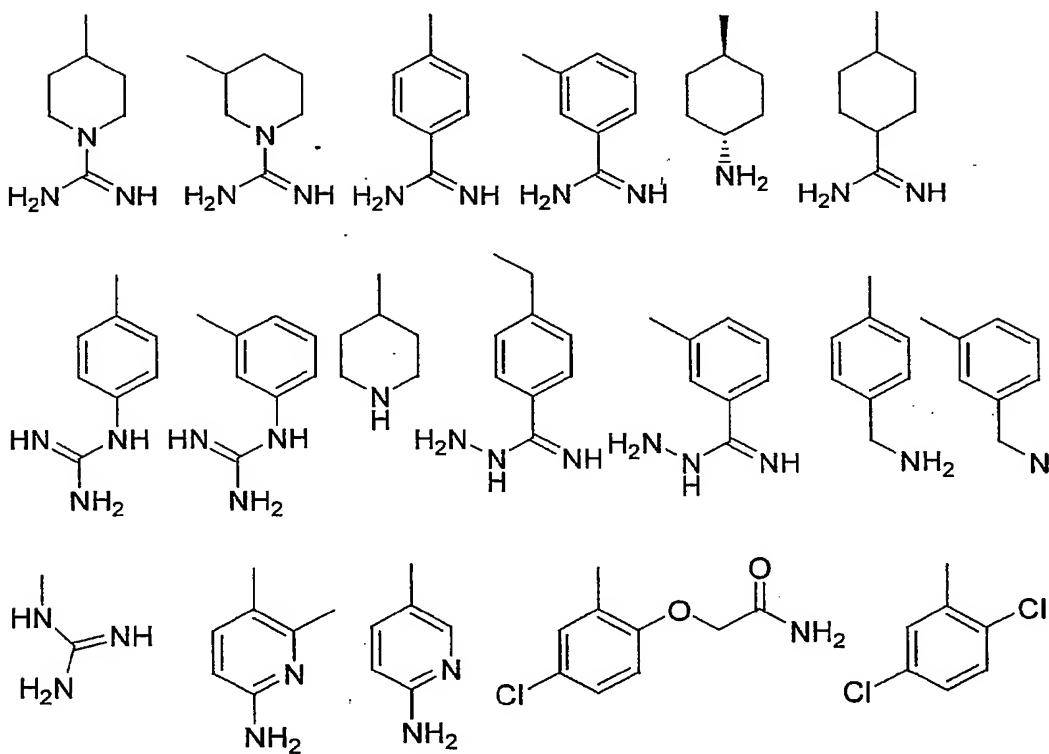
**45** 3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei C eine der folgenden Strukturen darstellt

**50**

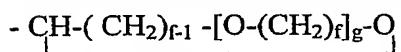
**55**

**60**

**65**



4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei X eine cyclische Struktur der Formel



aufweist und f und g wie in Anspruch 1 definiert sind.

5. Verbindung gemäß Anspruch 1 mit einer der folgenden Formeln Ia–If

5

10

15

20

25

30

35

40

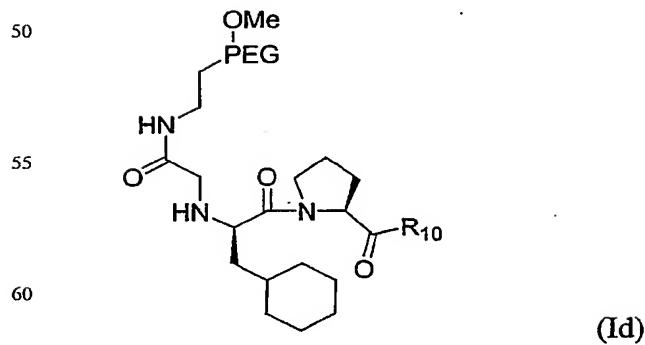
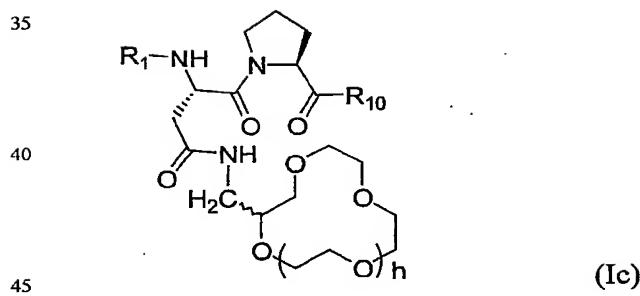
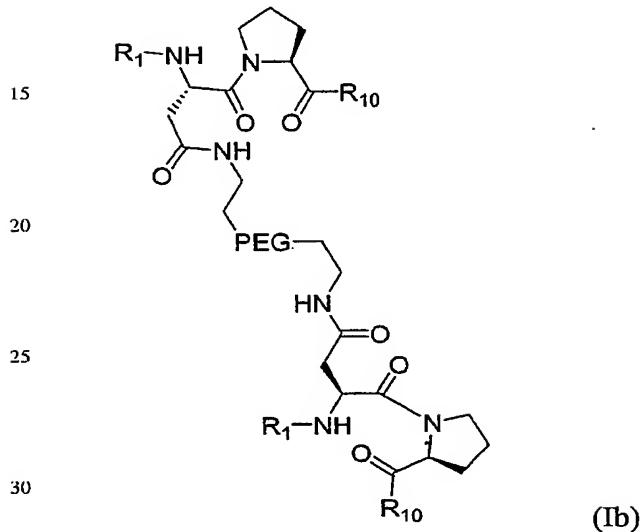
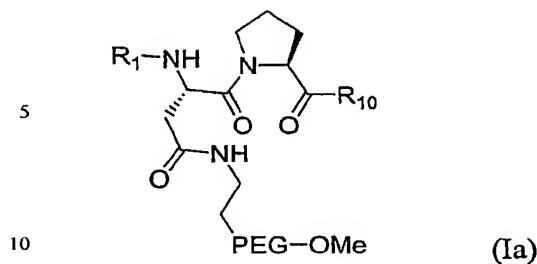
45

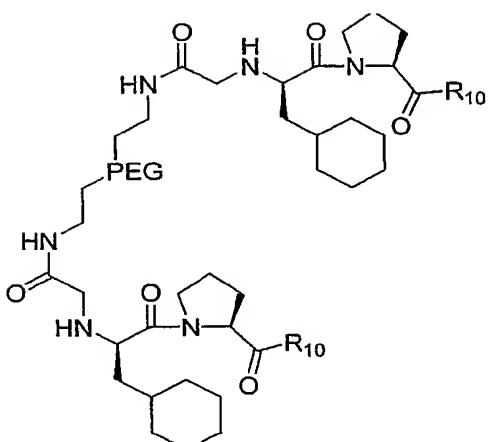
50

55

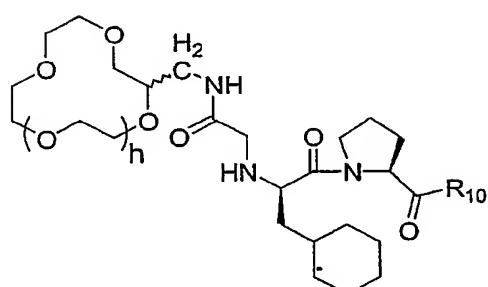
60

65



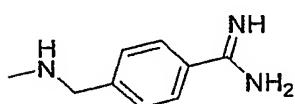


(Ie)

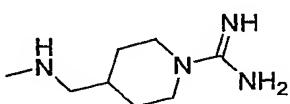


(If)

in denen R<sub>1</sub> ein 4-Methoxy-phenylsulfonyl- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest ist,  
PEG eine Polyethylenglykolstruktur der Formel -[O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>]<sub>i</sub>- darstellt, mit Werten für i von  
3 bis 1000,  
h für 1, 2, 3 oder 4 steht  
und R<sub>10</sub>



oder



ist.

6. Verfahren zur Erleichterung der renalen Eliminierung eines Thrombininhibitors, dadurch gekennzeichnet daß der Inhibitor in ein Oligo- oder Polyalkylenlykolkonjugat integriert wird, in dem eine kovalente Bindung zwischen dem Inhibitor und einer der Strukturen -[O-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>]<sub>e</sub>-OZ, -[O-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>]<sub>e</sub>-OZ oder

- CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>f-1</sub>-[O-(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>]-O

vorliegt, wobei d, e, f, g und Z wie in Anspruch 1 definiert sind.

7. Verfahren zur Verbesserung der Löslichkeit eines Thrombininhibitors im extrazellulären Wasserraum, dadurch gekennzeichnet daß der Inhibitor in ein Oligo- oder Polyalkylenlykolkonjugat integriert wird, in dem eine kovalente Bindung zwischen dem Inhibitor und einer der Strukturen -[O-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>]<sub>e</sub>-OZ, -[O-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>]<sub>e</sub>-OZ oder

- CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>f-1</sub>-[O-(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>]-O

vorliegt, wobei d, e, f, g und Z wie in Anspruch 1 definiert sind.

8. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 als Wirkstoff zur Therapie oder Prophylaxe thrombotischer Komplikationen, der überwiegend renal eliminiert wird.

9. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Beschichten einer Oberfläche.

10. Verfahren zur Modifikation einer Oberfläche, umfassend das in Kontakt bringen der Oberfläche mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.

11. Verbindung der Struktur

5

10

15

20

25

30

35

40

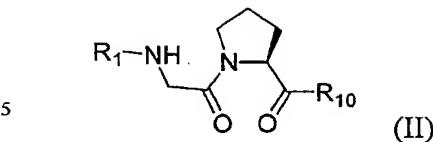
45

50

55

60

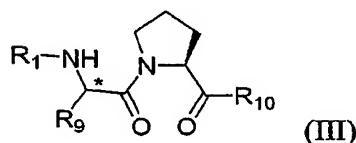
65



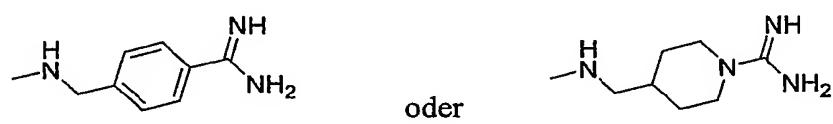
wobei R<sub>1</sub> einen 4-Methoxy-phenylsulfonyl- oder einen 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest darstellt und R<sub>10</sub>



15 ist.  
12. Verbindung der Struktur



wobei  
25 R<sub>1</sub> einen 4-Methoxy-phenylsulfonyl- oder einen 4-Methoxy-1,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest darstellt,  
R<sub>9</sub> einen der Reste -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-C(O)OR<sub>11</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-R<sub>12</sub>, oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-C(O)NH<sub>2</sub> darstellt, wobei  
R<sub>11</sub> ein Wasserstoffatom, ein C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkylrest, ein C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub> Aralkylrest oder ein C<sub>6</sub> bis C<sub>12</sub> Alkylrest ist, R<sub>12</sub> eine der Gruppen NH<sub>2</sub>, OH oder SH ist, und j 1, 2, 3 oder 4 ist,  
R<sub>10</sub>



35 ist,  
und am mit \* gekennzeichneten C-Atom eine L-Konfiguration vorliegt.  
13. Verbindung gemäß Anspruch 12, wobei R<sub>11</sub> eine Methyl-, Ethyl- oder Benzylgruppe ist.

40 Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

**- Leerseite -**

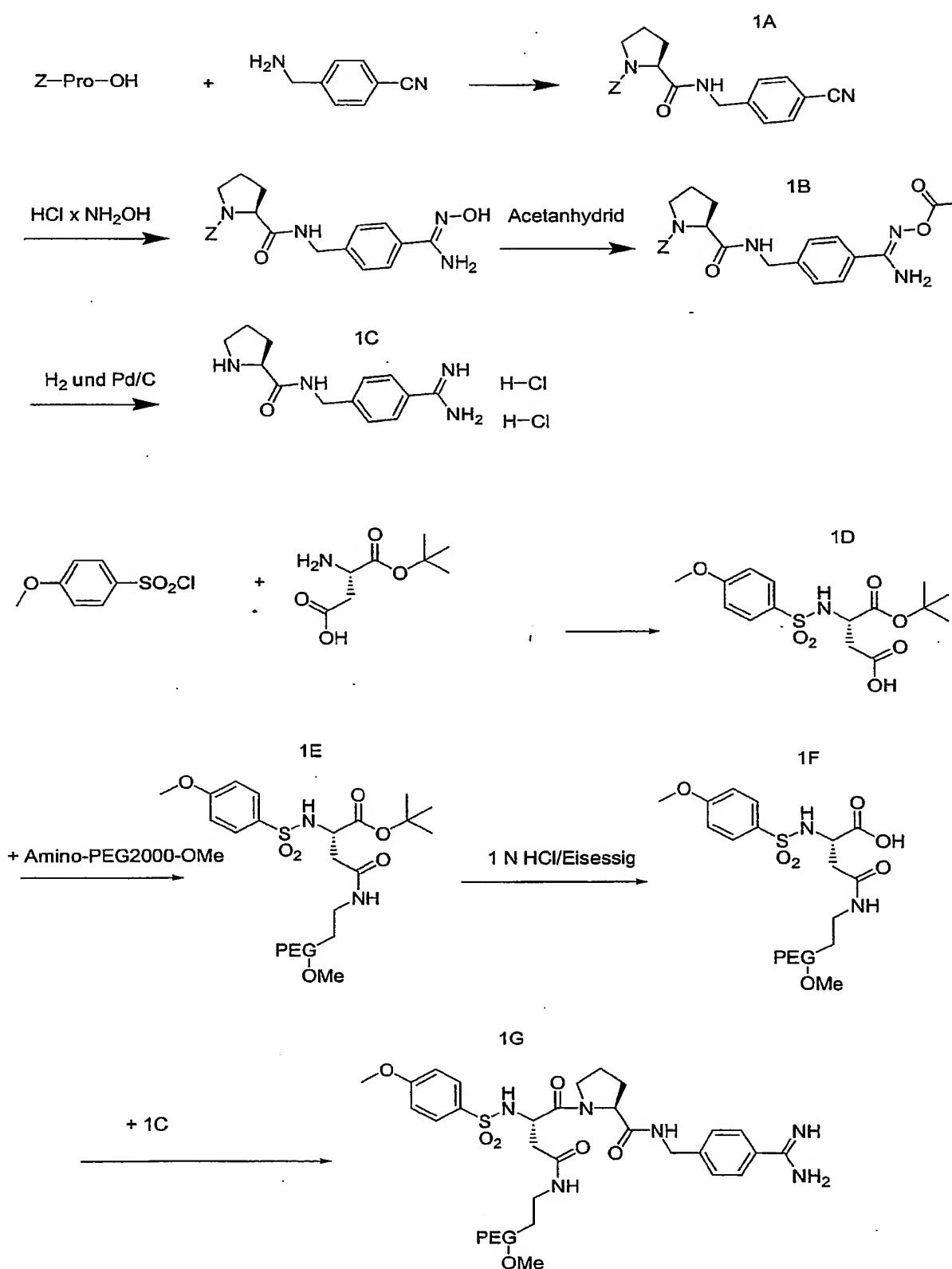


Abb.1

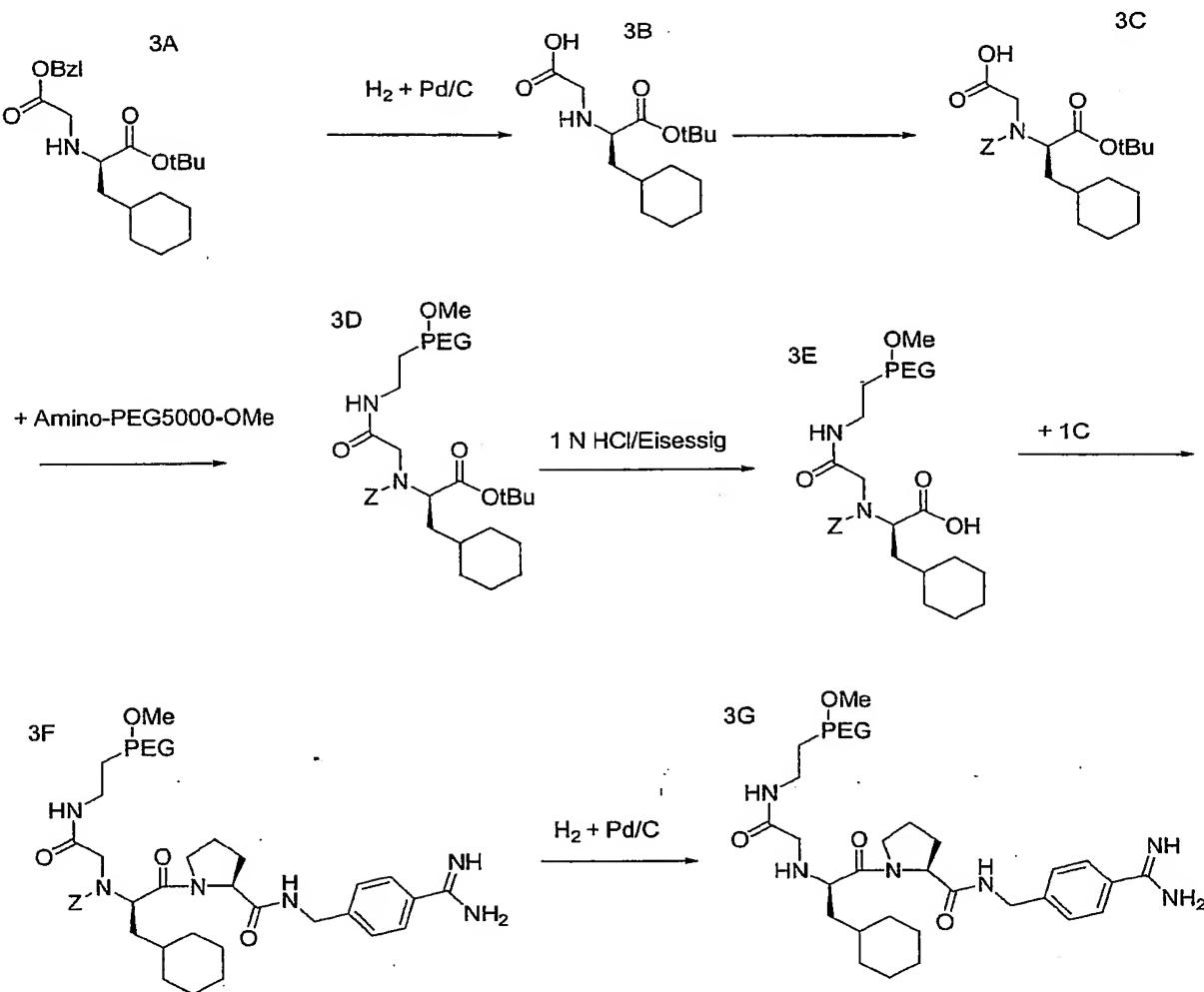


Abb.2

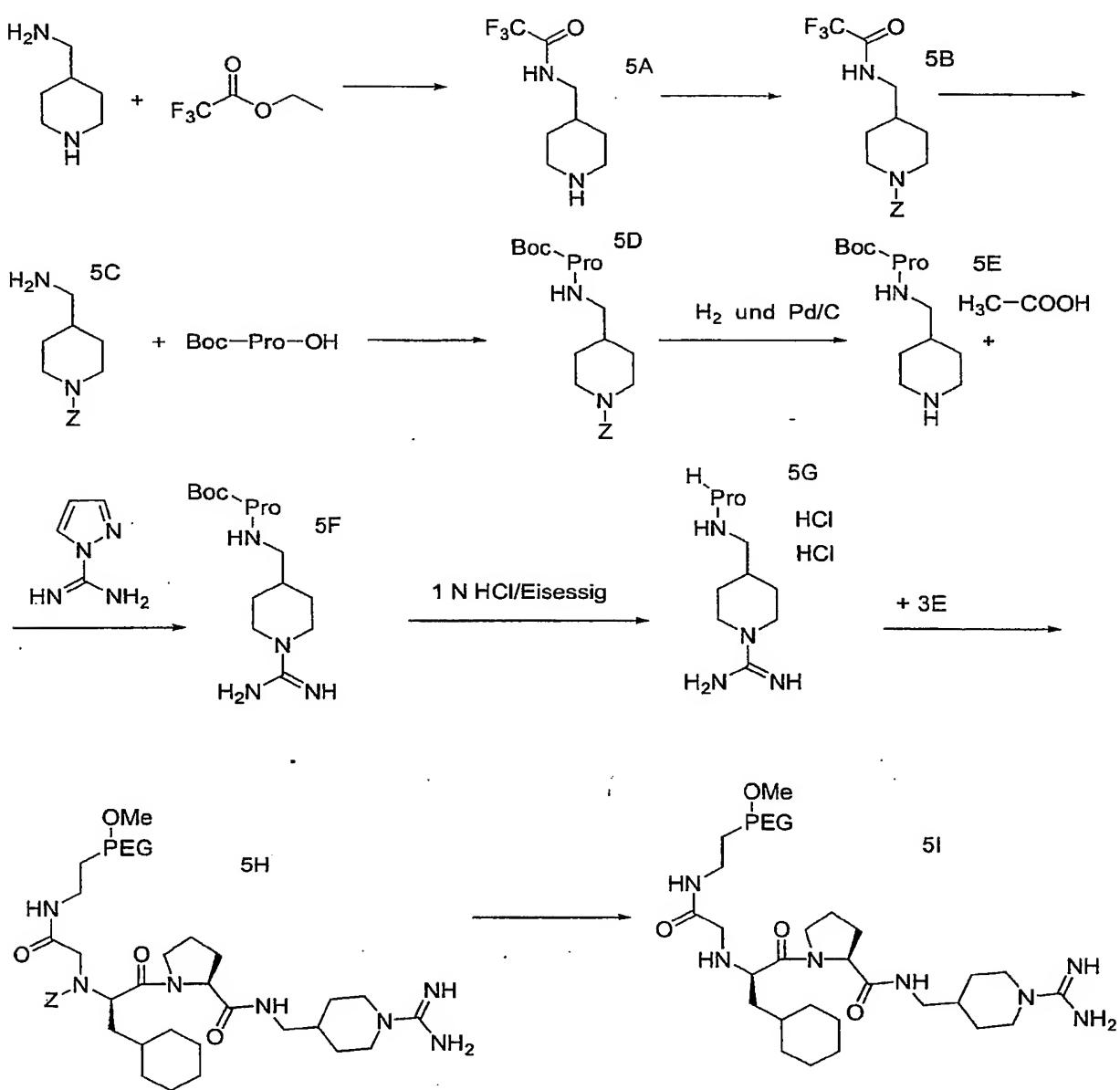
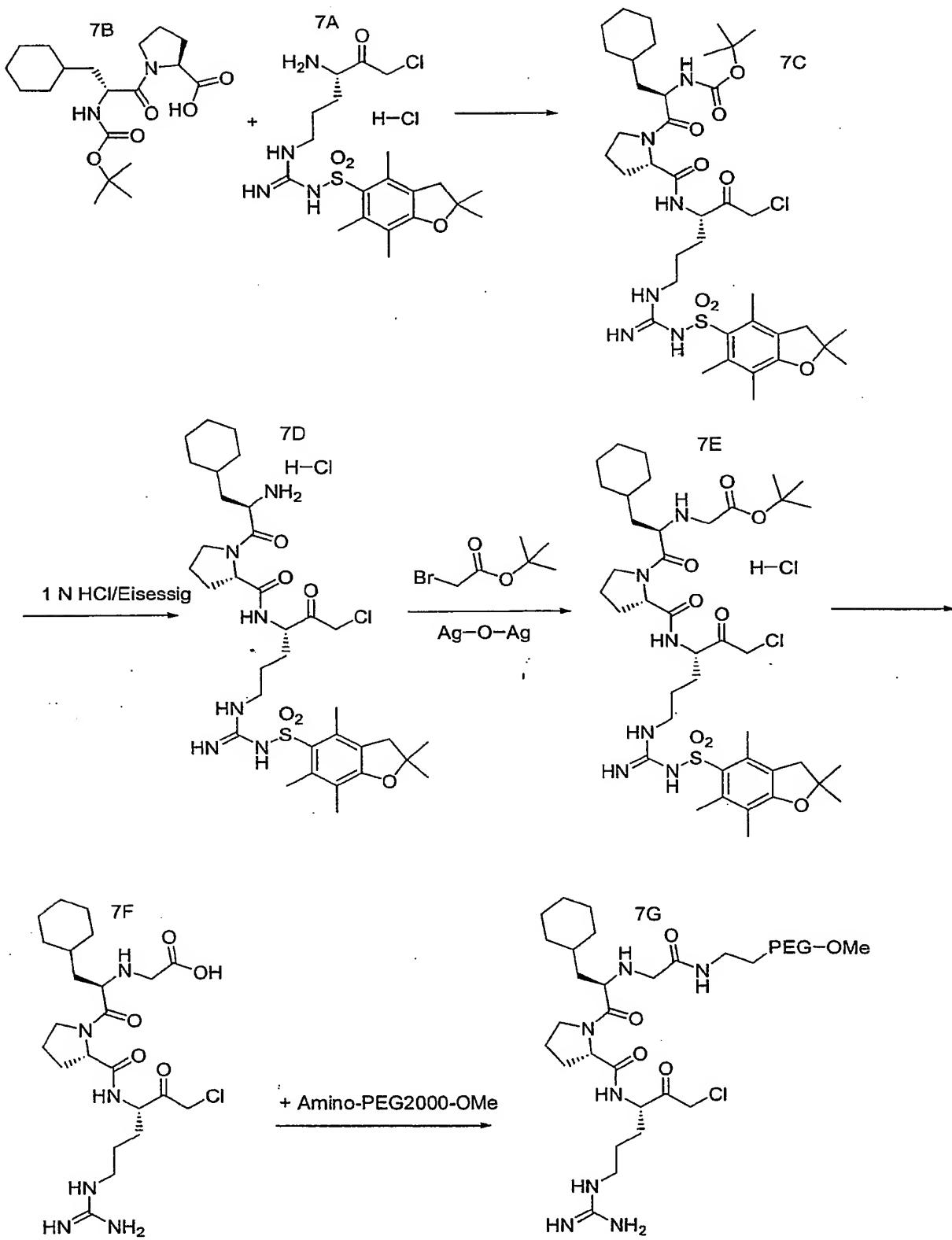


Abb.3



5 Abb.4

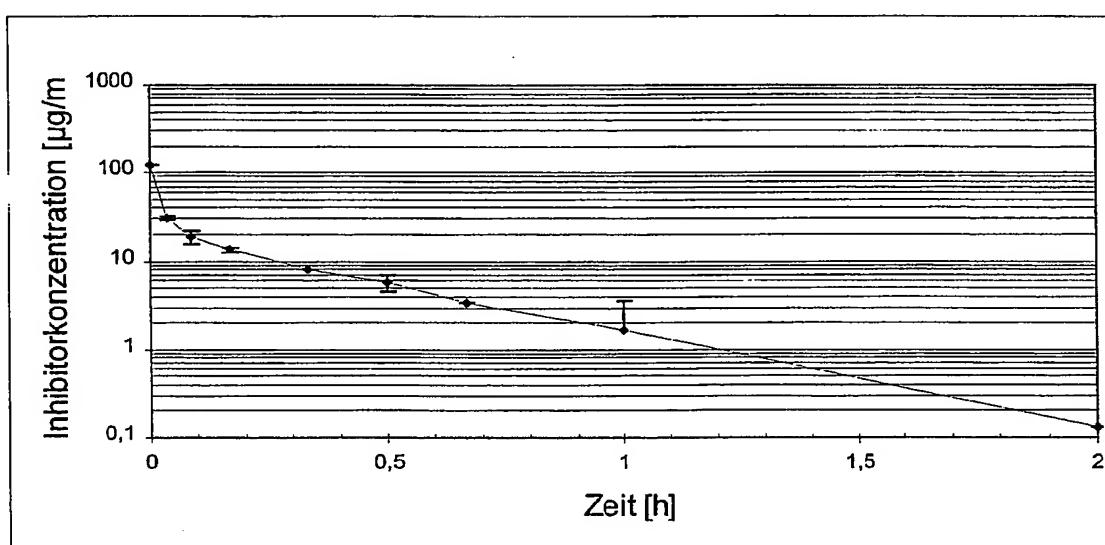


Abb. 5

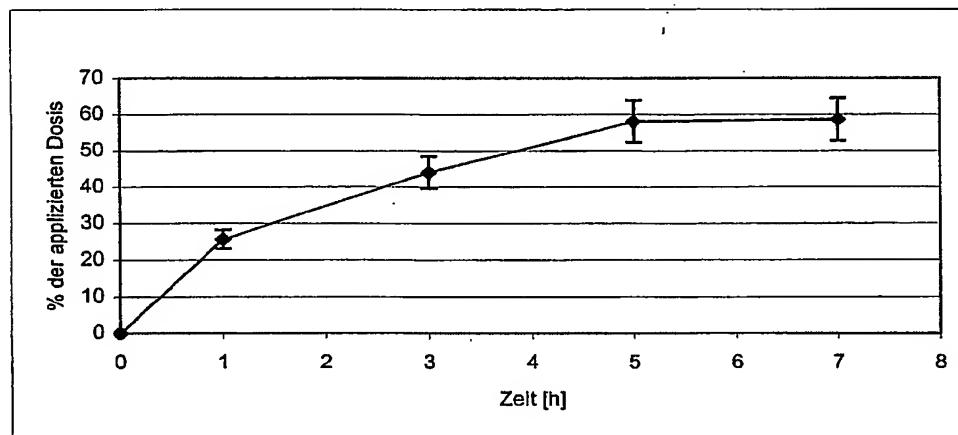


Abb. 6

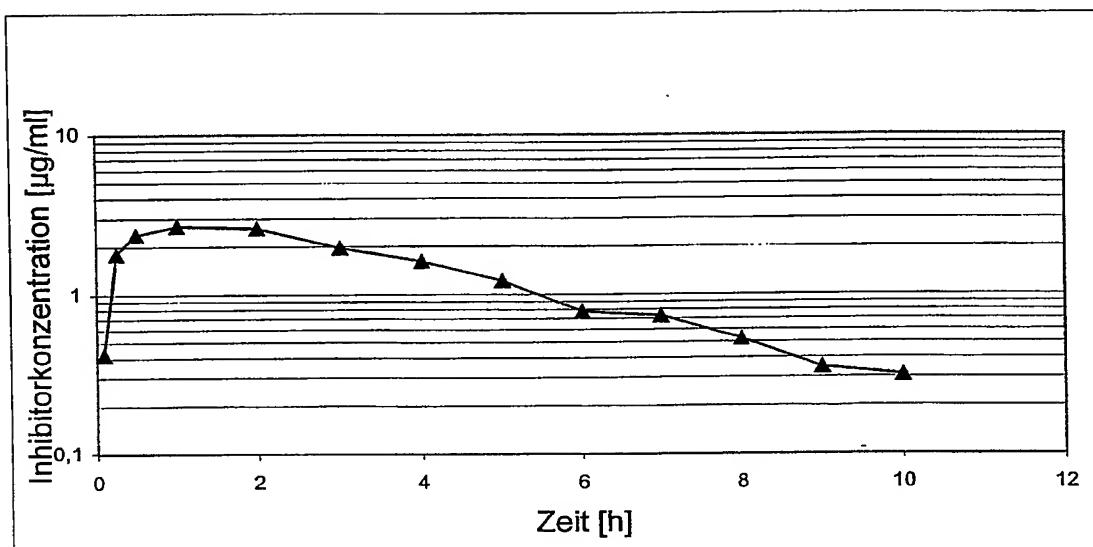


Abb.7

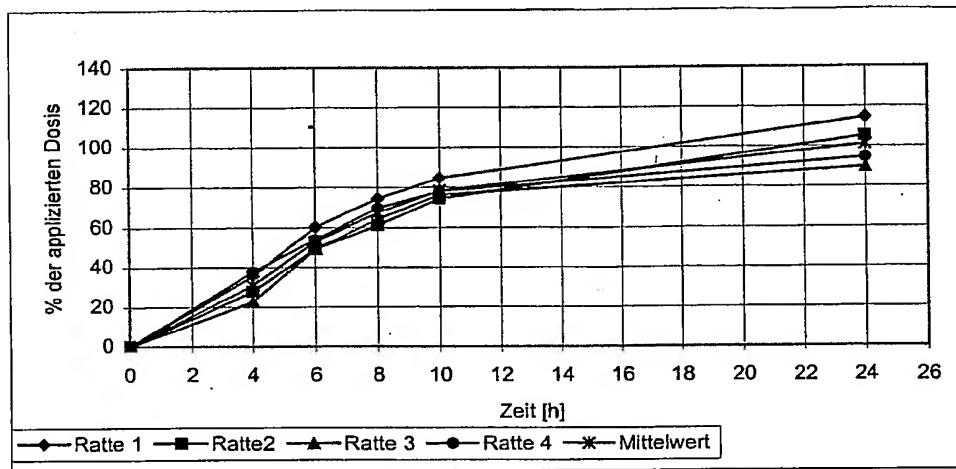


Abb.8

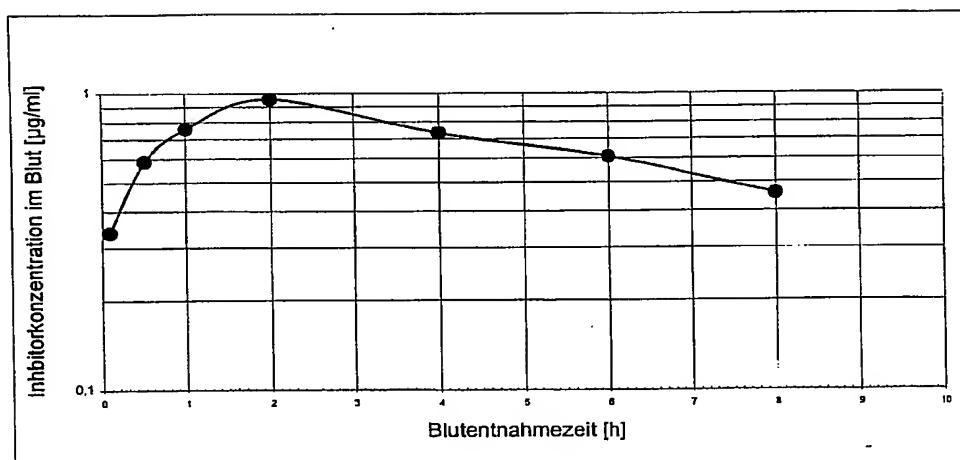


Abb.9



# Espacenet

## Bibliographic data: DE 10102878 (A1)

### Oligo- oder Polyalkylengekoppelte Thrombininhibitoren

Publication date:	2002-08-01
Inventor(s):	STEINMETZER TORSTEN [DE]; NOWAK GOETZ [DE] ±
Applicant(s):	HAEMOSYS GMBH [DE] ±
Classification:	 - international: A61K38/00; A61K47/48; A61P7/02; C07K5/062; C07K5/065; C07K5/072; C08G65/329; C08G65/333; C08G65/334; (IPC1-7): C07K5/078 - European: A61K47/48H4P; C08G65/329
Application number:	DE20011002878 20010123
Priority number (s):	DE20011002878 20010123
Also published as:	<ul style="list-style-type: none"><li>● <a href="#">US 2005070479 (A1)</a></li><li>● <a href="#">US 7407982 (B2)</a></li><li>● <a href="#">JP 2004525888 (T)</a></li><li>● <a href="#">EP 1355674 (A2)</a></li><li>● <a href="#">EP 1355674 (B1)</a></li><li>● <a href="#">more</a></li></ul>
Cited documents:	<a href="#">EP0658585 (A2)</a> <a href="#">View all</a>

### Abstract of DE 10102878 (A1)

The invention relates to novel, covalent oligo and polyalkylene glycol conjugates containing synthetic inhibitors of trypsin-type serine protease, in particular inhibitors of the haemocoagulation protease thrombin. The invention also relates to synthetic intermediate stages required in the production of said conjugates and to the use of the latter for producing active agents for the treatment or prophylaxis of thrombotic complications.